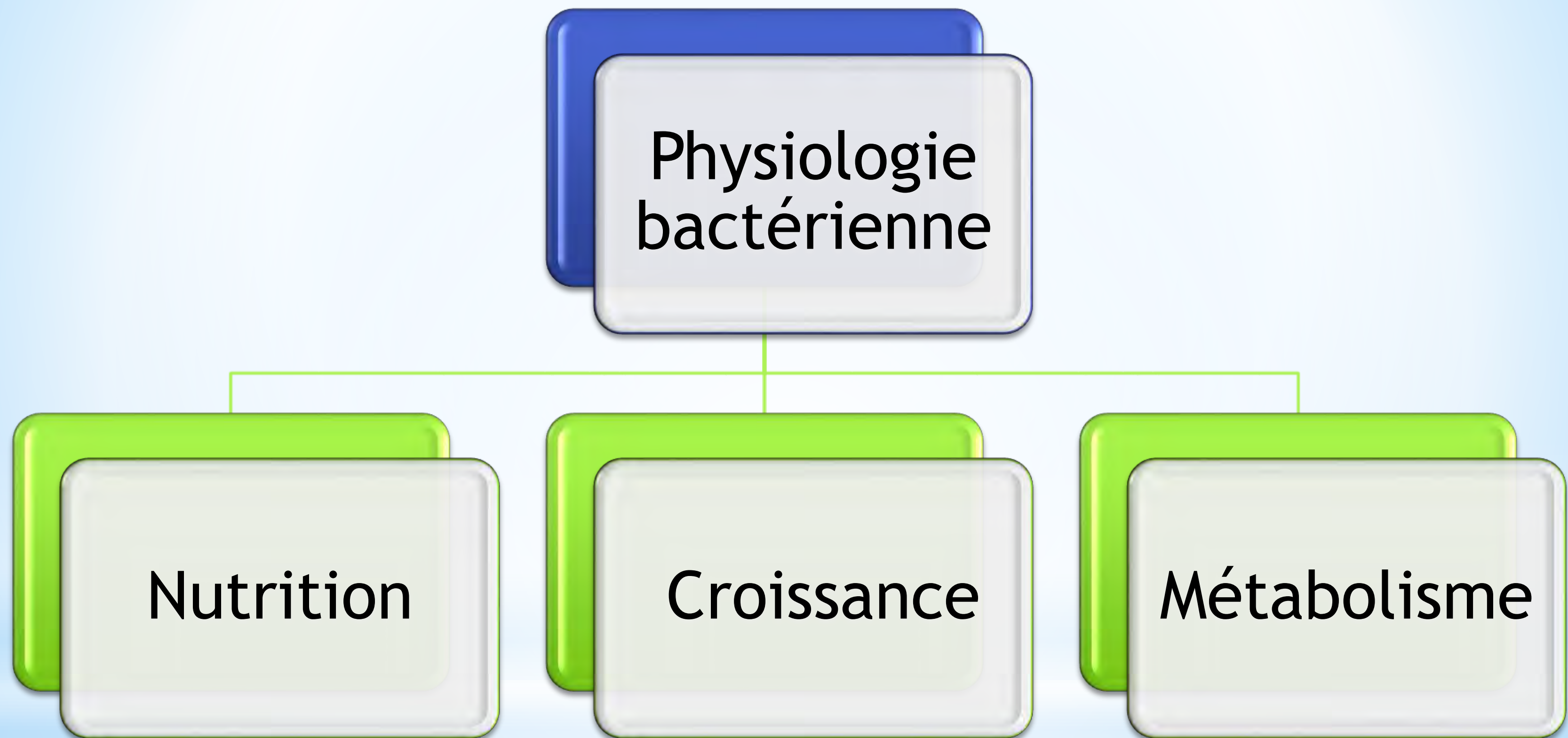
* Physiologie Bactérienne

Nutrition –Métabolisme -Croissance


Physiologie bactérienne
Nutrition
Croissance
Métabolisme

*Nutrition bactérienne

C’est l'analyse des besoins **élémentaires** , **énergétiques** et **spécifiques** nécessaires au fonctionnement et à la croissance de la bactérie , ainsi que des facteurs physico-chimiques susceptibles de les influencer.

* Composition Chimique de la Bactérie

- **H2O** : 75 à 90 % de son poids total

- **Matière sèche** :

* 50 % de Carbone
* 20 % d' Oxygène
* 8 à 15 % d' Azote
* 10 % d' Hydrogène
* 1 à 6 % de Phosphore
* 0,1 à 1 % de Soufre
* Autres : Potassium , Calcium, Magnésium,
* Chlore, Sodium, Zinc, Cobalt , Manganèse …..
: 0,3 % (traces)

1.Besoins élémentaires:

* L'eau: **H20**

- Besoin majeur
- composition de tous les milieux de culture
- source d' H2 et d' O2.

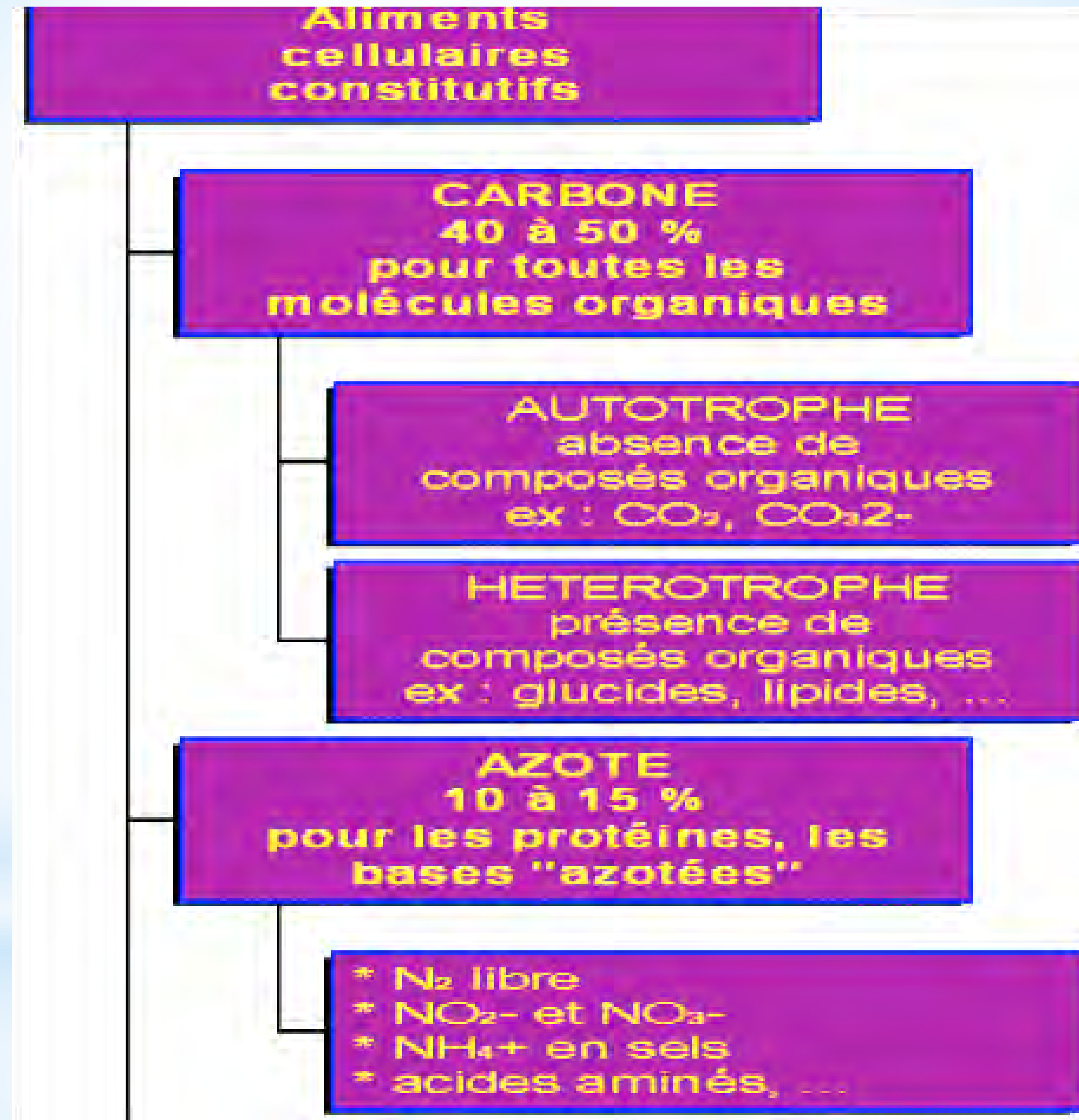
* **En grande quantité :** l'oxygène, l'hydrogène ,l'azote, le carbone le phosphore et le soufre,

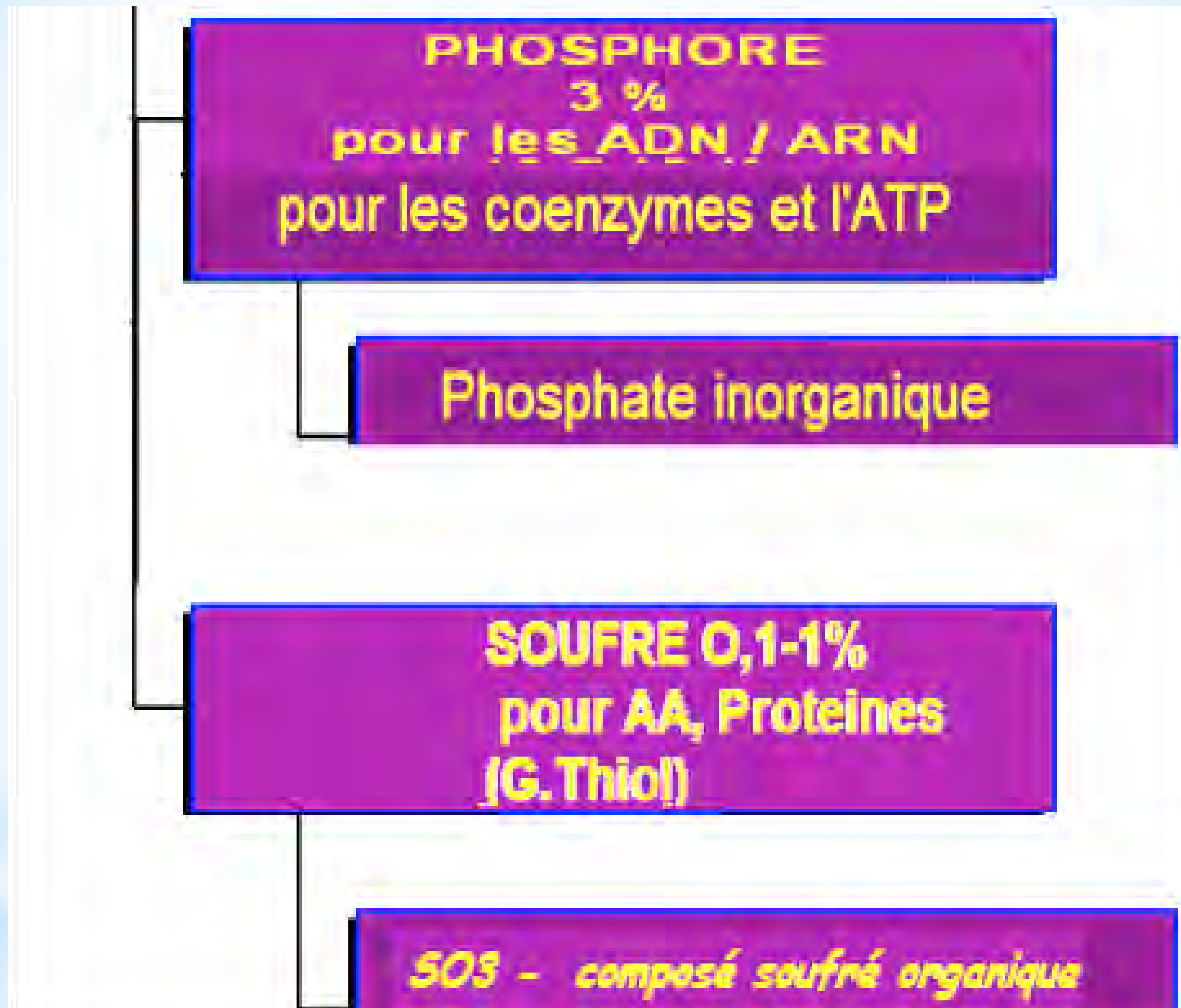
* **En quantité plus faible:** des ions minéraux (Mg,K,Cl,Fe, Na...)
  - **équilibre physico-chimique de la bactérie**
  - **enzymes ou coenzymes : Fe (cytochromes) .**

0.14 mg de Fer/l pour synthèse de la toxine diphtérique ,

Fer+Magnésium pour production de Prodigiosine chez *Serratia marcescens*.

* **Sous forme de traces:** des oligoéléments : **(indispensables en quantité infime) : Ca , Mg , Co , Cu, Zn , Mn….**


Aliments cellulaires constitutifs
CARBONE
40 à 50 %
pour toutes les molécules organiques
AUTOTROPHE
absence de composés organiques
ex : CO_2, $CO_3$2-
HETEROTROPHE
présence de composés organiques
ex : glucides, lipides, ...
AZOTE
10 à 15 %
pour les protéines, les bases "azotées"
* N_2 libre
* NO_2- et NO_3-
* NH_4+ en sels
* acides aminés, ...

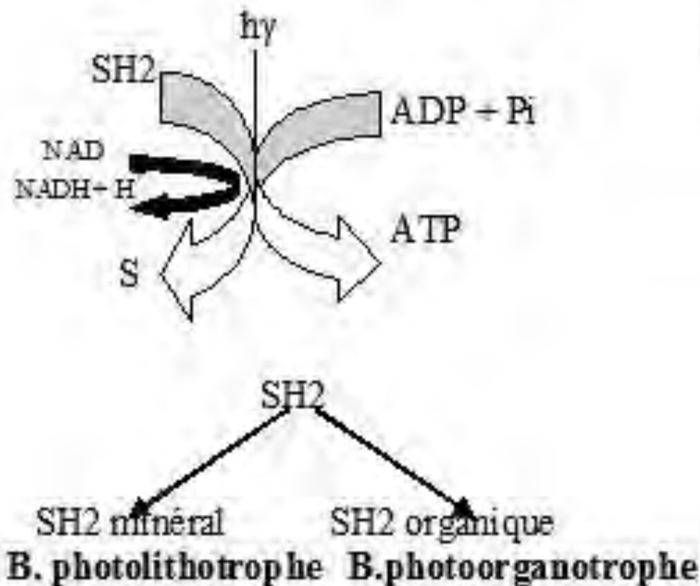

PHOSPHORE
3 %
pour les ADN / ARN
pour les coenzymes et l'ATP
Phosphate inorganique
SOUFRE 0,1-1%
pour AA, Proteines
(G.Thiol)
SO3 - composé soufré organique

2.Besoins énergétiques

- soit l'énergie lumineuse (bactéries **Phototrophes**),
- soit l'énergie fournie par les processus d'oxydo-réduction (bactéries **Chimiotrophes**).

Bactéries Phototrophes

Elles utilisent un substrat oxydable minéral ou organique , comme source d'électrons.

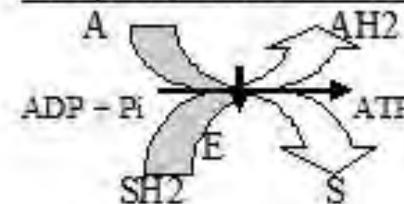


B. photolithotrophe B.photoorganotrophe

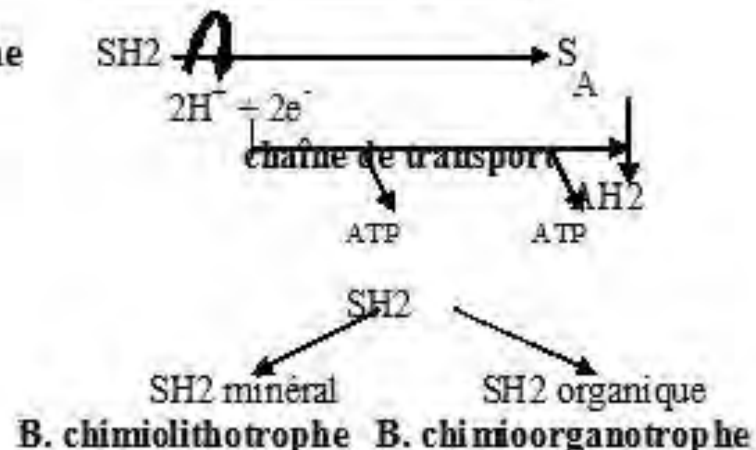
Bactéries Chimiotrophes

Elles puisent leur énergie au niveau de réaction REDOX , couplant une réaction d'oxydation d'un substrat SH2 à une réaction de réduction .L'énergie est fabriquée au cours de ces réactions REDOX par Phosphorylation. On distingue 2 types de Phosphorylation :

- Phosphorylation au niveau du substrat :



- Phosphorylation oxydative :



B. chimiolithotrophe B. chimioorganotrophe

- **Photolithotrophe :** capable de se développer dans un milieu purement minéral comme le font les végétaux :exemple les bactéries sulfureuses pourpres ou vertes.

- **Photo-organotrophe** :exemple les bactéries pourpres non sulfureuses.

- **Chimiolithotrophe**, exemple bactérie oxydant l'hydrogène .

- **Chimio-organotrophe (** bactéries pathogènes d' intérêt médical, de contamination alimentaire, d'usage industriel …)

3. Substances spécifiques:

* métabolites essentiels dont certaines bactéries ont besoin et qu'elles sont incapables de synthétiser par défaut enzymatique.
* Facteurs de croissance.
* Acides aminés ,bases puriques et pyrimidiques ou des vitamines.
* besoins quantitatifs de 10 µg (AA , bases)et de 1µg (vitamines).
* Caractères communs:
  - actifs à concentration infime
  - étroitement spécifiques

* Bactéries **Auxotrophes (Exigeantes) .**

* Bactéries **Prototrophes (non exigeantes).**

Exemples :

* **E.Coli :** n'exige aucun facteur de croissance, se multiplie sur milieu minimum.

* **Haemophilus influenzae :** bactérie auxotrophe.
  exige facteur V (coenzyme I et II) et facteur X (Hémine).

Culture

d' Escherichia coli

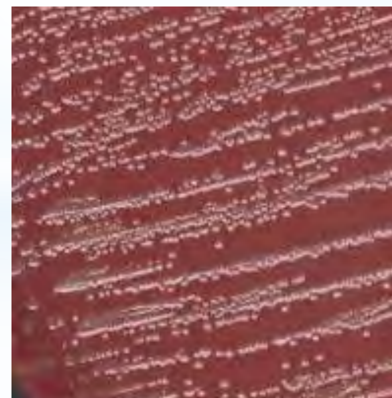


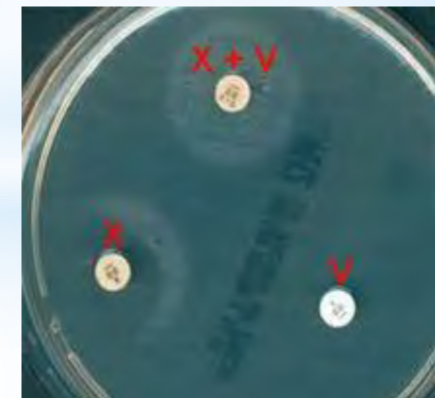
Culture
d' Haemophilus influenzae

et

test du satellitisme







4- Facteurs influençant la croissance

* La Température optimale de croissance
  * les bactéries mésophiles : 20°C -40°C (mésophiles saprophytes (30°C) , mésophiles pathogènes (37°C): Bactéries pathogènes , bactéries des cavités naturelles , peau, muqueuses…)
  * Les bactéries thermophiles : 45°C -65°C , généralement 55°C. bactéries des sources thermales .ex. Bacillus et Clostridium.
  * Les bactéries psychrophiles : 0°C 10°C ou 20°C. Contaminants des produits laitiers , des produits biologiques (sang ou dérivés sanguins) ex. Pseudomonas , Acinetobacter, Aeromonas.
  * Les bactéries cryophiles : < 0°C :bactéries des océans et des glaciers.

* Le pH

Neutre ou légèrement alcalin (7 –7.5).

Exemples :

- **E.coli cultive entre pH 4.4 et pH8**
- **Lactobacillus acidophilus cultive mieux à pH 6**
- **Vibrio cholerae se multiplie au pH optimal de 9**

* La Pression Osmotique

Les bactéries tolèrent des variations de concentrations ioniques .

Certaines bactéries tolèrent des concentrations salines importantes ex. Enterococcus (6.5% Nacl)

Staphylococcus aureus (7.5%Nacl)

* La Pression partielle d' Oxygène

1 – Bactérie aérobie stricte :
ex : Pseudomonas aeruginosa

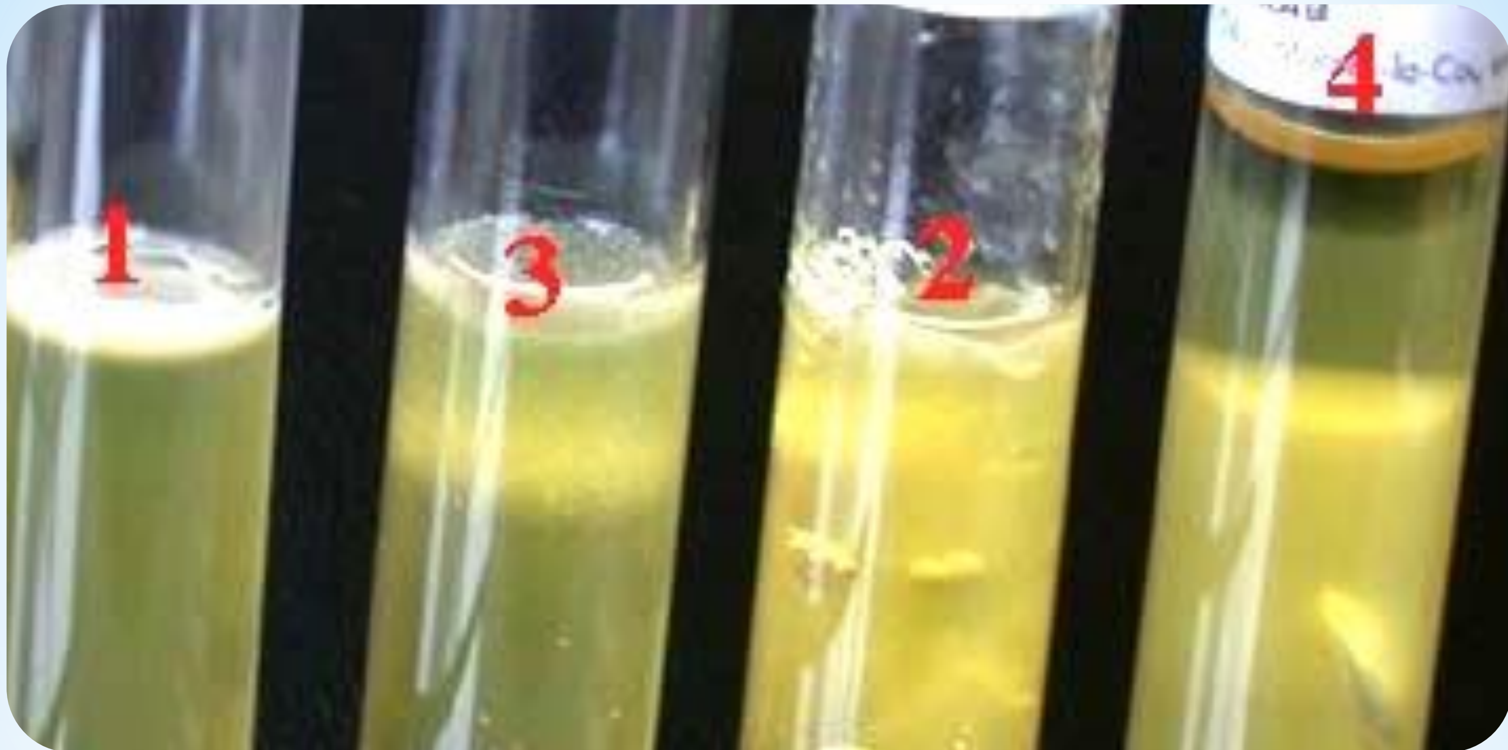
2- Bactérie Microaérophile :
ex: Campylobacter jejuni

3- Bactérie aérobie-anaérobie facultative : ex. les Entérobactéries

4- Bactérie anaérobie stricte :
ex.Bacteroides fragilis



Gélose VF
(Viande-Foie)



Aérobie Stricte	MicroAérophile	Aérobie-Anaérobie facultative	Anaérobie Stricte

5- Généralités sur les Milieux de culture

* Le milieu de culture doit apporter à la bactérie un mélange équilibré de tous les nutriments nécessaires, à des concentrations qui permettent une croissance optimale, c'est à dire :
- ni trop faible, sinon le milieu s'appauvrit vite et la bactérie cultive mal ;
- ni trop forte sinon le milieu devient vite toxique.
* La composition du milieu de culture varie à l'infini.
* Elle est choisie en fonction du but à atteindre et des besoins requis par la bactérie.
* Le milieu peut être liquide ou solidifié par addition d'Agar : C'est une substance extraite d'algues rouges desséchées (Agar-agar) et qui possède la propriété de fixer une grande quantité d'eau d'où gélification.

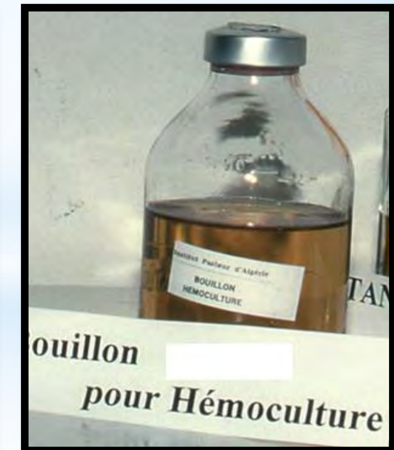
Composition chimique	Consistance	Utilisation
Naturels ou Complexes Semi-synthétiques Synthétiques	milieu liquide (ex. bouillon de Clark Lubs) milieu solide ou gélosé (ex. gélose Chapman) milieu semi-liquide ou faiblement gélosé (ex. milieu Mannitol-mobilité).	les milieux usuels ou de base (ex. gélose nutritive , bouillon nutritif) les milieux enrichis (ex. gélose au sang , Bouillon pour Hémoculture) les milieux sélectifs ou électifs (ex. gélose Hektoen) les milieux d' identification (ex. milieu TSI) les milieux de conservation les milieux de transport (milieu T.G.V.)


Milieu de Chapman
Milieu de Drigalski
Milieu SS




Bio CASTANEDA
CASTANEDA AEROBIE


Bio ANAER
CASTANEDA
ANAEROBIE


ouillon
pour Hémoculture

*Croissance bactérienne

Définition

* Dédoublement à intervalle régulier de la masse bactérienne et du nombre de cellules d' une culture bactérienne.

(une bactérie, donnant naissance par scissiparité , à 2 nouvelles bactéries identiques).

* **Temps de génération** :Temps requis pour un dédoublement
  ex. E.coli :TG= 20mn M.tuberculosis : TG= 20 h
* **Taux de croissance** : nombre de divisions par unité de temps

* Conséquences: Au cours de la croissance, le milieu s'appauvrit en éléments nutritifs disponibles et s'enrichit en produits du catabolisme, souvent toxiques .
* Des modifications touchent le pH, le potentiel Redox (oxydo-réduction) , la pression osmotique …

*Techniques de mesure de la croissance bactérienne :

a- Dénombrement direct des bactéries :

a-1- Numération totale :

- Examen au microscope à l'aide d'une cellule hématimétrique
- Mesure automatisée avec un compteur de particules , des bactéries en suspension dans une solution d' électrolyte
- Méthode d'épifluorescence (Acridine Orange)

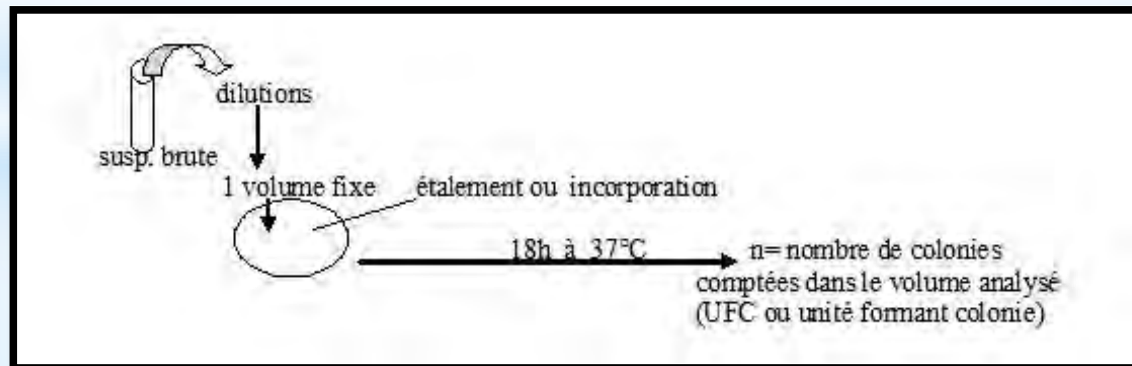
a-2- Numération des cellules viables :

* Les bactéries cultivables forment des colonies sur un milieu de culture approprié : on utilise la culture en boîtes de Pétri ou Plate Count.

* Inconvénient :

- Plusieurs cellules agglomérées peuvent ne donner qu'une seule colonie.

- De nombreuses cellules isolées ne forment pas nécessairement de colonie.



b- Mesure de la biomasse :

b-1- détermination du poids sec :

* Inconvénient : toute la masse cellulaire est mesurée . De plus , c'est une technique longue et délicate.

b-2- Mesure de la Densité optique (DO) :

On évalue la DO du milieu de croissance en fonction du temps , à une longueur d'onde donnée .

* Application : inoculum pour antibiogramme = 0,5 Mac Farland (DO entre 0,08 et 0,1 à 625 nm).

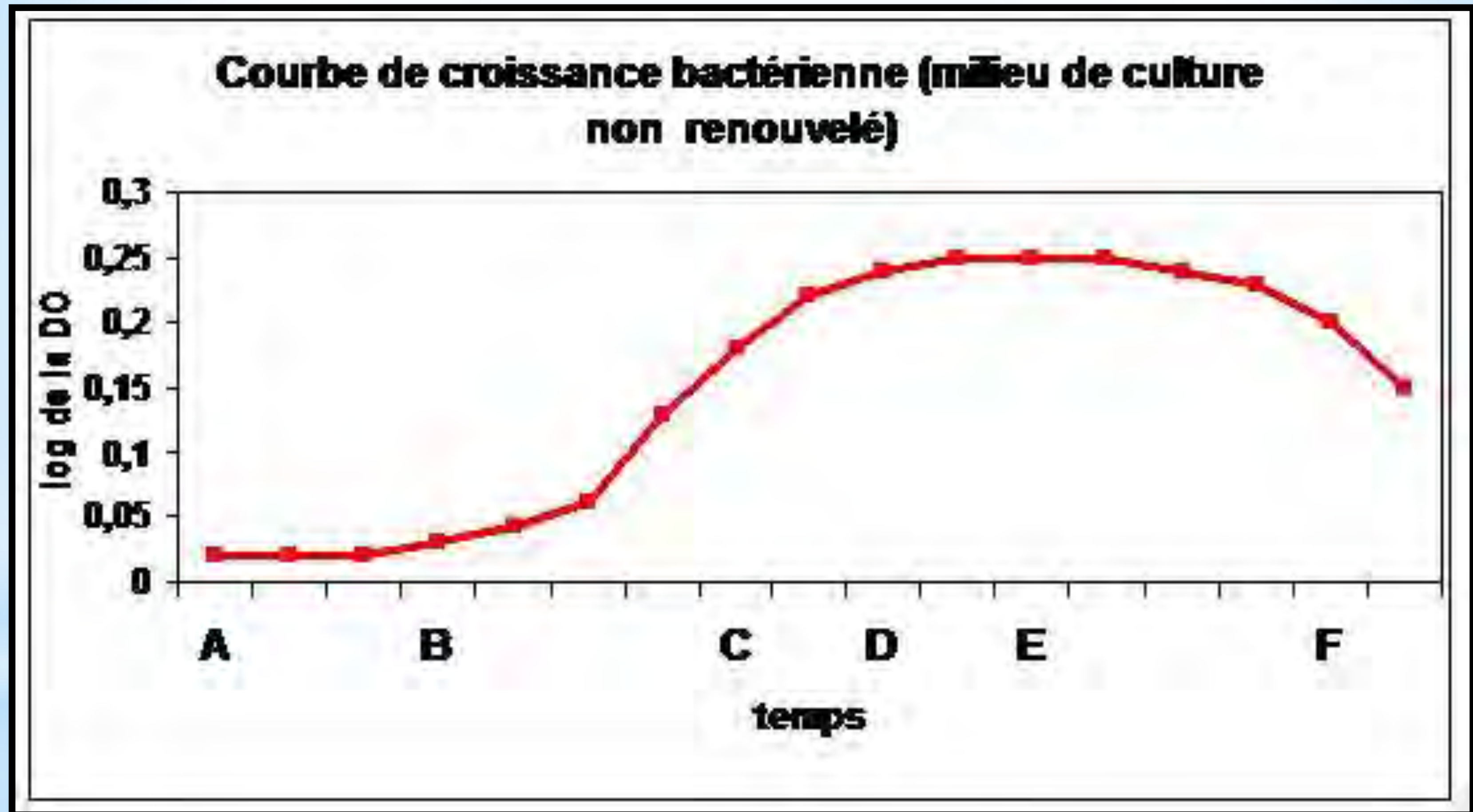
b-3- Technique de la Cytométrie en flux : Elle consiste à mesurer un ou plusieurs paramètres spécifiques d'une cellule isolée , entraînée par un flux liquide . Cette technique est couramment appliquée en hématologie . Elle est encore en cours d' évaluation en microbiologie.

c- Marqueurs chimiques :

Il s’agit du dosage des protéines , DNA , ATP, peptidoglycane résultant de la croissance bactérienne.

On peut aussi détecter le C02 produit par le métabolisme bactérien :Principe utilisé par les automates d’ hémoculture.

3- Cinétique de la croissance bactérienne :



* **Phase A**: Phase de latence
* **Phase B** : Phase d'accélération
* **Phase C**: Phase de croissance exponentielle : Le taux de croissance atteint la valeur maximale .
* **Phase D**: Phase de ralentissement
* **Phase E**: Phase stationnaire: La masse bactérienne est maximale .
* **Phase F**: Phase de déclin: La masse bactérienne décroît du fait de la lyse accélérée des bactéries.

4- modifications de la courbe de croissance :

a- Croissance continue :

* utilisées dans l'industrie pour obtenir des corps bactériens de même âge (préparation de vaccins bactériens), ou des métabolites bactériens (vitamines) ,des toxines bactériennes (préparation d'anatoxines) en grande quantité.

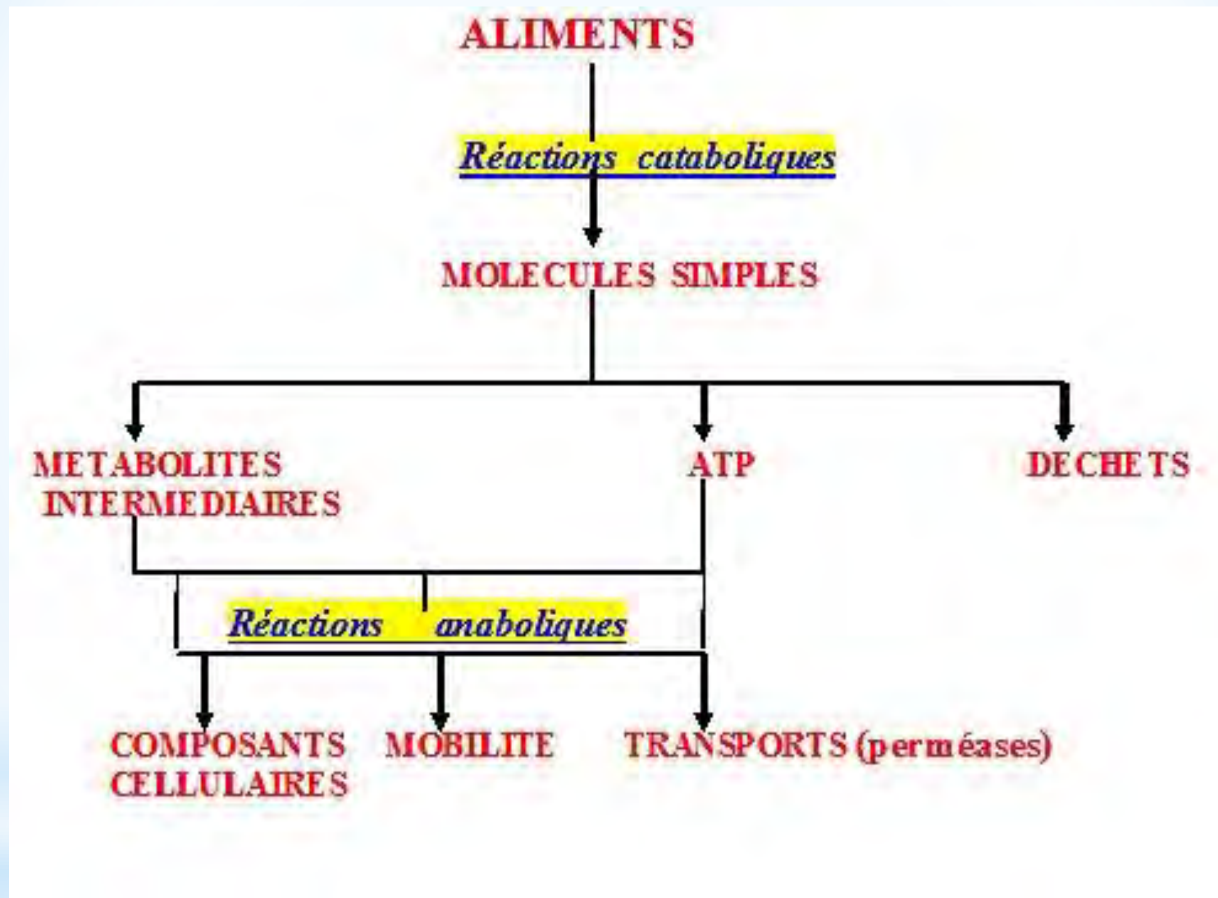
b- La diauxie : on fournit à la bactérie 2 sources de carbone et d'énergie.

* METABOLISME BIOCHIMIQUE BACTERIEN

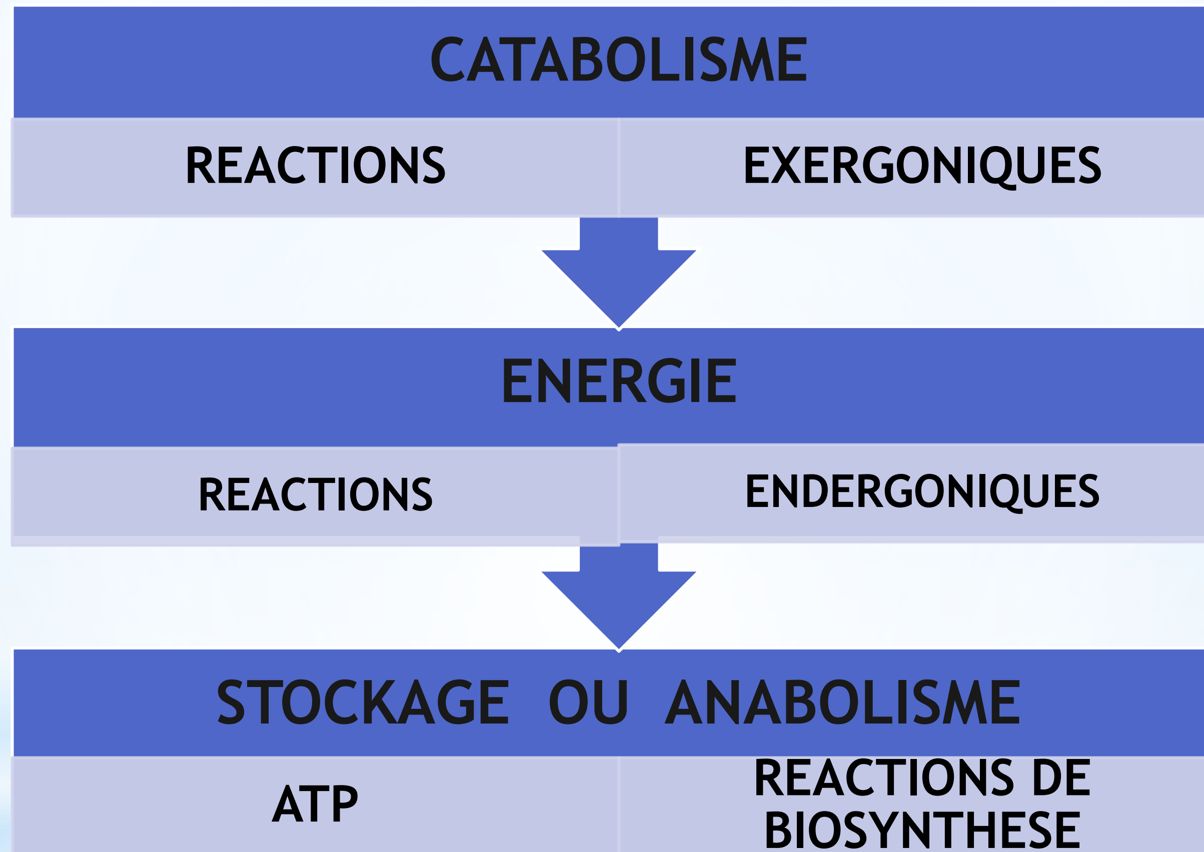
1- Définition :

* Transformations chimiques (réactions de biosynthèse et de dégradation), qui assurent l'élaboration des constituants bactériens et leur fonctionnement.

* Permet de définir des caractères d'identification biochimique qui représentent des critères essentiels dans la classification (ou Taxonomie) bactérienne.


ALIMENTS
Réactions cataboliques
MOLECULES SIMPLES
METABOLITES INTERMEDIAIRES
ATP
DECHETS
Réactions anaboliques
COMPOSANTS CELLULAIRES
MOBILITE
TRANSPORTS (perméases)

2- Métabolisme énergétique :

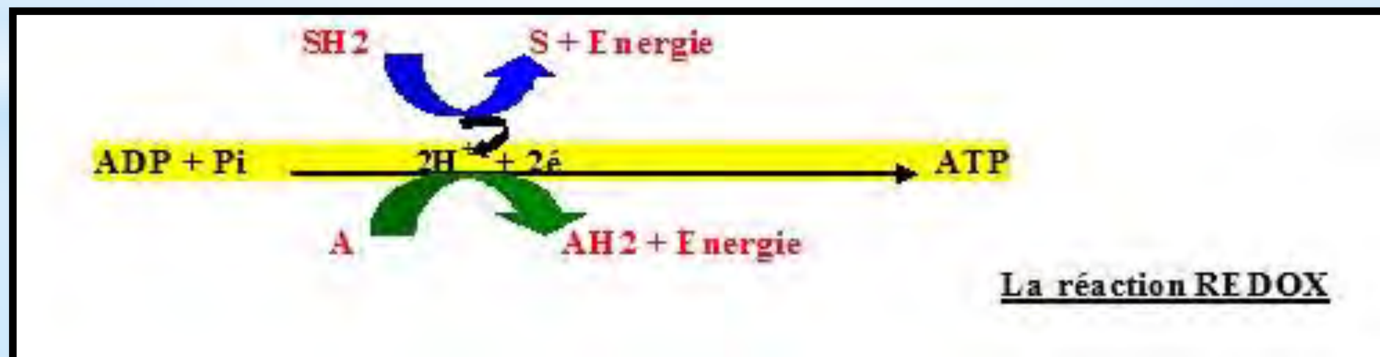


2-1- Généralités

* **métabolisme énergétique** d'une bactérie chimio-organotrophe = réactions REDOX avec libération d' énergie , partant d' un substrat organique .

* Le composé organique peut être :

- un hydrate de carbone (surtout le glucose) source la plus importante d' énergie
- un acide aminé
- un acide gras
- un alcane
- une base purique ou pyrimidique

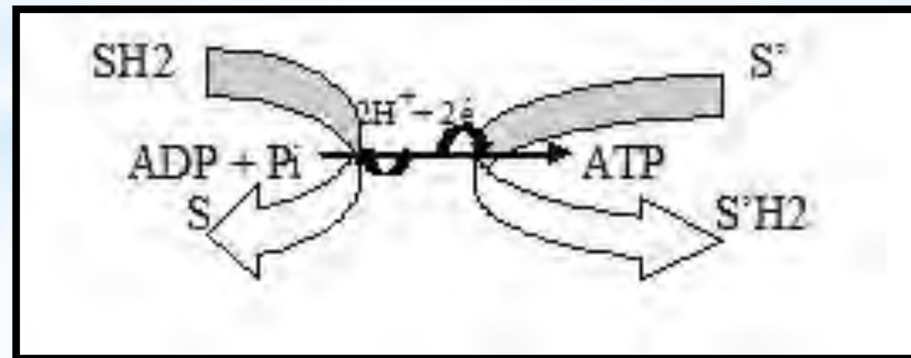


Les réactions redox (Oxydo-réduction) productrices d'énergie sont intégrées dans 2 types de processus énergétiques :

La Fermentation et la Respiration

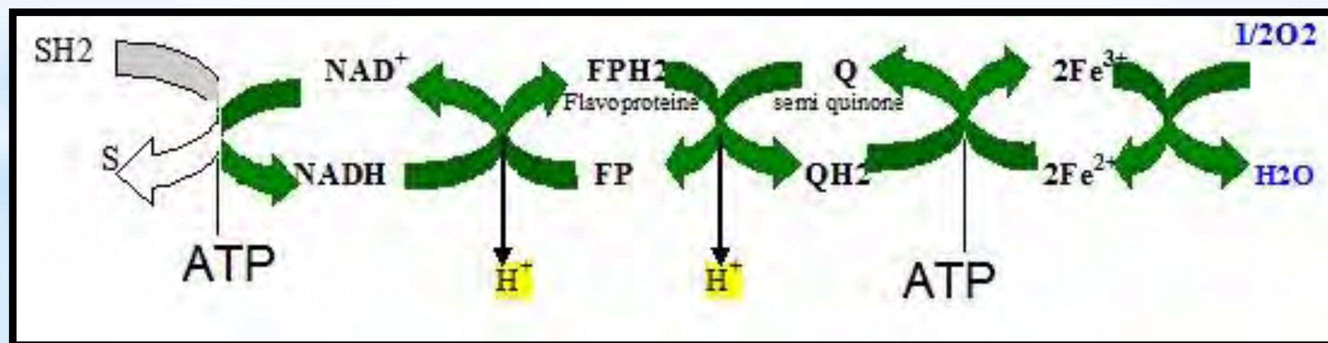
La fermentation (vie sans air) .

* Oxydation biologique au cours de laquelle l'accepteur final d' H2 et d'(é) est un composé organique. Ce composé peut être présent dans le milieu ou provenir de la dégradation d' un substrat oxydable . Les voies fermentaires se déroulent au sein du cytoplasme bactérien. L' énergie est produite par Phosphorylation au niveau du substrat. Le bilan énergétique est réduit.



La Respiration

* Voies métaboliques au cours desquelles l'oxygène moléculaire ou des composés oxygénés inorganiques ou ioniques jouent le rôle d'accepteur d'électrons et d'H2 dans les réactions redox. Ces voies sont liées à la membrane cytoplasmique de la bactérie. L'énergie est produite par phosphorylation dite oxydative et libérée par paliers via une chaîne de transfert d'électrons ; Le bilan énergétique est élevé.



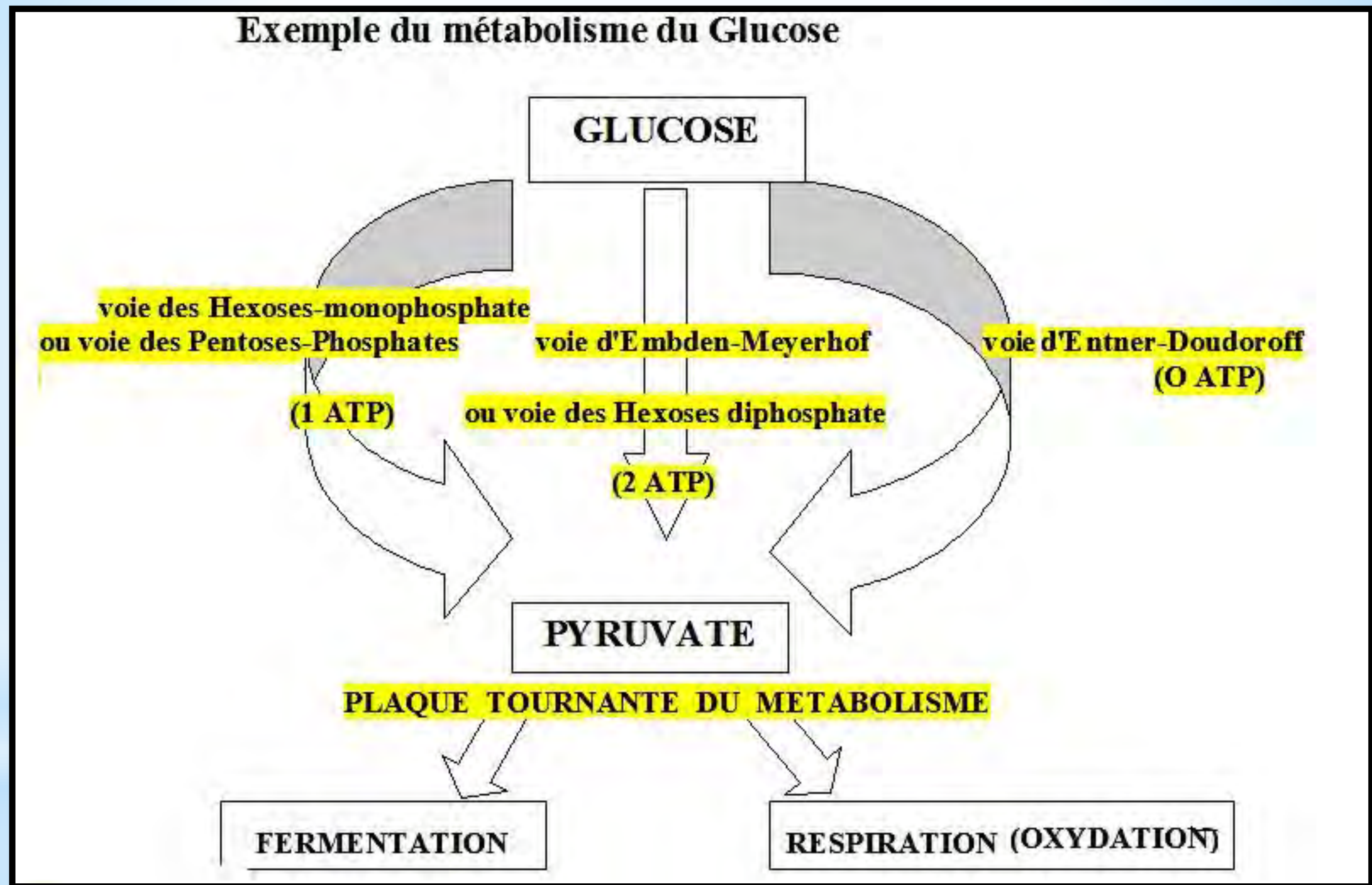
2-2- Voies du Métabolisme intermédiaire

* 3 principales voies enzymatiques , à localisation cytoplasmique , qui oxydent le glucose en acide pyruvique , (plaque tournante du métabolisme):

- La voie d' embden-Meyerhof ou voie des **Hexoses-Diphosphates** , voie comparable à la voie de la glycolyse des êtres supérieurs (2 moles d' ATP/mole de glucose)

- La voie des **Hexoses-Monophosphates** ou voie des Pentoses-Phosphates ou Shunt oxydatif ou cycle de Dickens-Horecker (1 mole d' ATP / mole de glucose)

- La voie du **2-céto-3-déoxy-gluconate** ou voie d' Entner-Doudoroff (0 ATP).

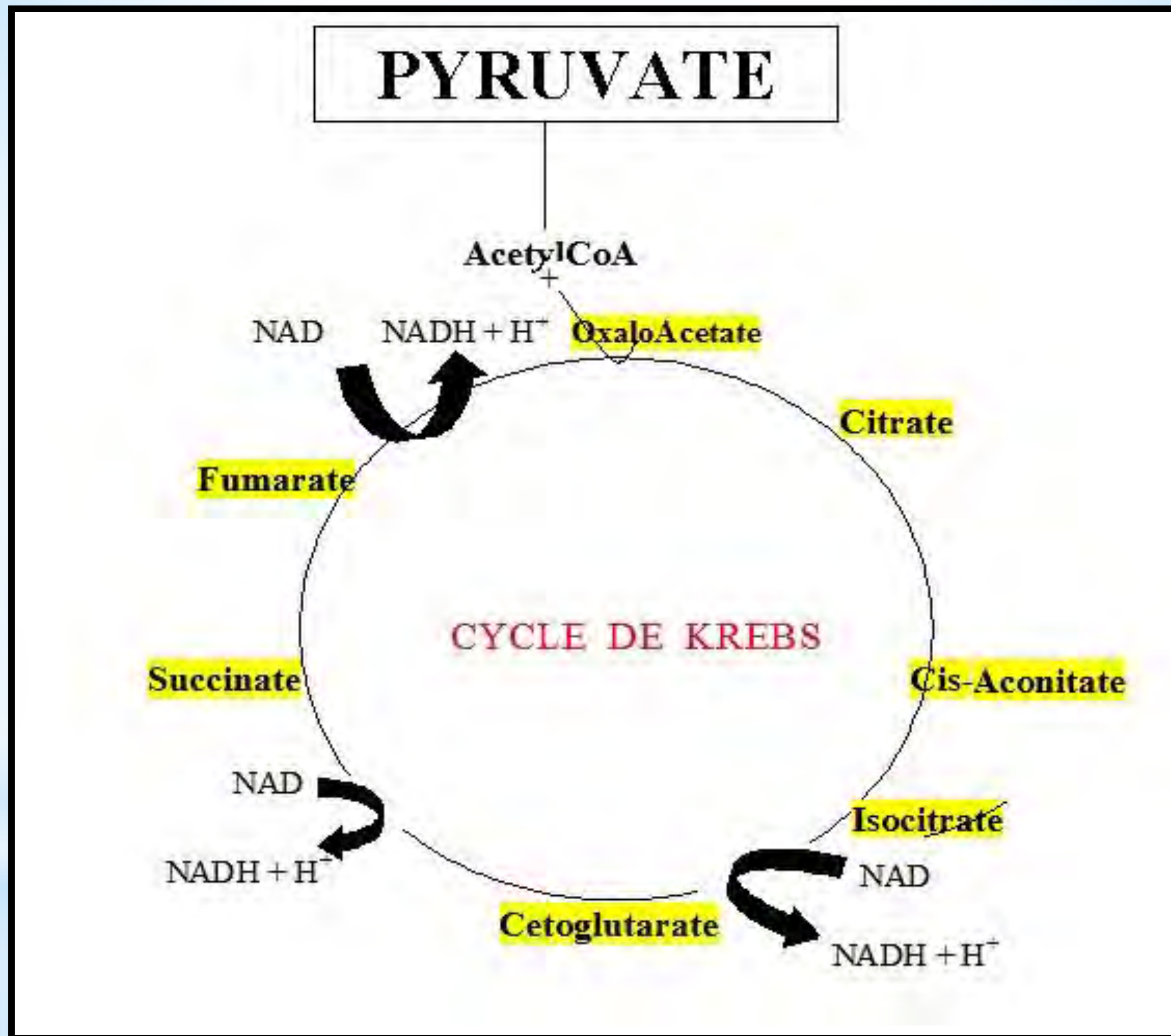

Exemple du métabolisme du Glucose
GLUCOSE
voie des Hexoses-monophosphate
ou voie des Pentoses-Phosphates
(1 ATP)
voie d'Embden-Meyerhof
ou voie des Hexoses diphosphate
(2 ATP)
voie d'Entner-Doudoroff
(O ATP)
PYRUVATE
PLAQUE TOURNANTE DU METABOLISME
FERMENTATION
RESPIRATION (OXYDATION)

2-3- La respiration :

* Le Pyruvate est transformé en Acetyl~CoA par décarboxylation oxydative

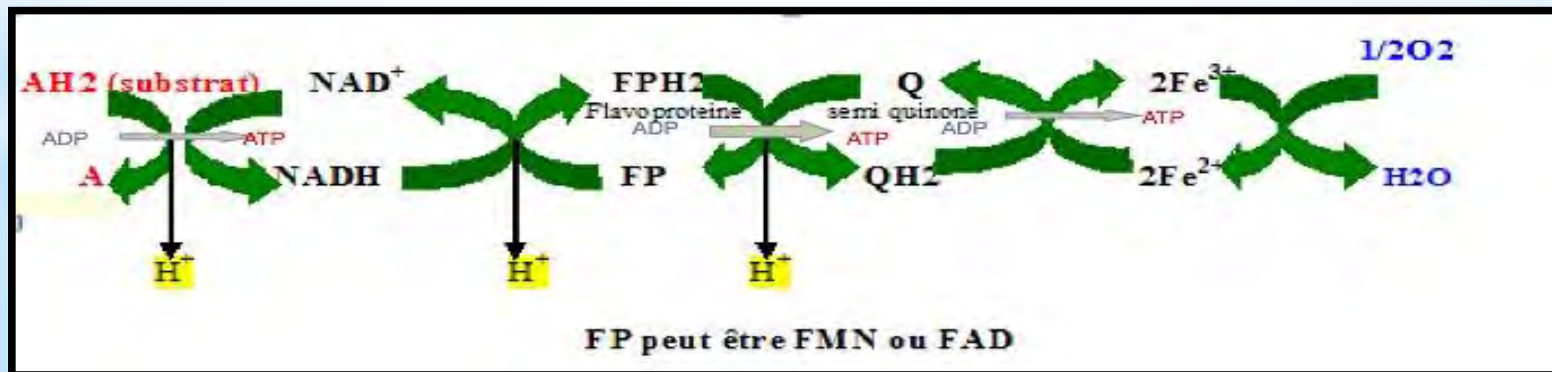
2-3-1- Le cycle de Krebs :

* L'Acetyl~CoA réagit avec l'acide oxaloacétique pour former de l'acide citrique succession de réactions d'oxydation et de décarboxylation , avec réductions de NAD en NADH2 couplées aux réactions d'oxydation .
* Du point de vue énergétique , chaque tour de cycle de Krebs génère 4 réactions de déshydrogénation donc un bilan énergétique de 12 ATP.


PYRUVATE
AcetylCoA
+
NAD
NADH + H+
OxaloAcetate
Citrate
Fumarate
CYCLE DE KREBS
Succinate
Cis-Aconitate
NAD
NADH + H+
Isocitrate
NAD
Cetoglutarate
NADH + H+

2-3-2- La chaîne respiratoire :

- Chaîne cytochromique de transfert des électrons
- y sont associés des phosphorylations oxydatives
- Ses composants sont disposés de façon séquentielle en fonction de leur potentiel redox;
- Le mouvement des électrons ou des protons : des constituants les plus électronégatifs vers le constituant le plus électropositif (O2). Ces composants sont des enzymes associés à des groupements prosthétiques et qui agissent comme transporteurs d'électrons.



* **La respiration se fait donc en 2 étapes :**

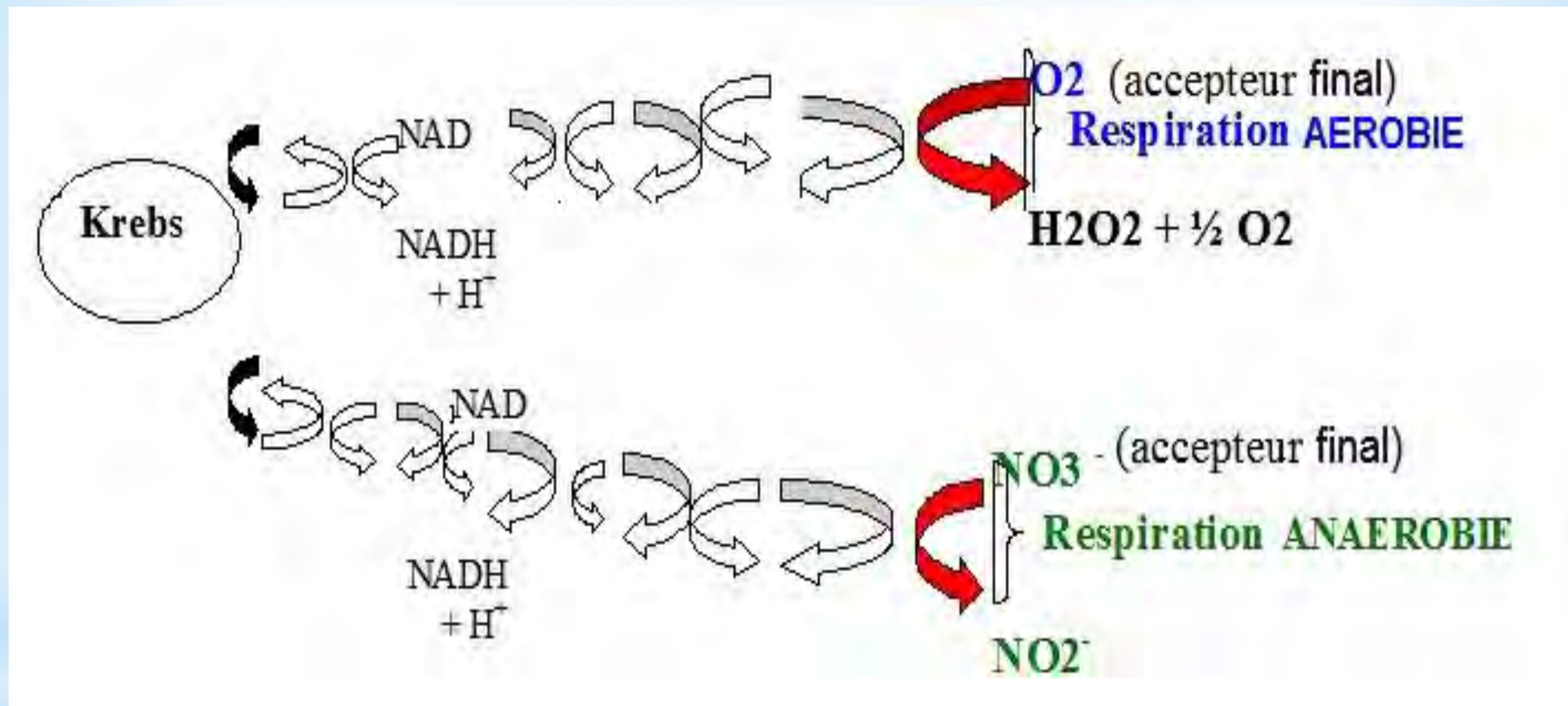
1/Le cycle tricarboxylique de Krebs , avec libération de CO_2 par oxydation couplée à la réduction de 3 NAD^+ et de 1 FAD^+ par tour de cycle .

2/ La chaîne respiratoire avec coenzymes de déshydrogénases , Quinones et Cytochromes .

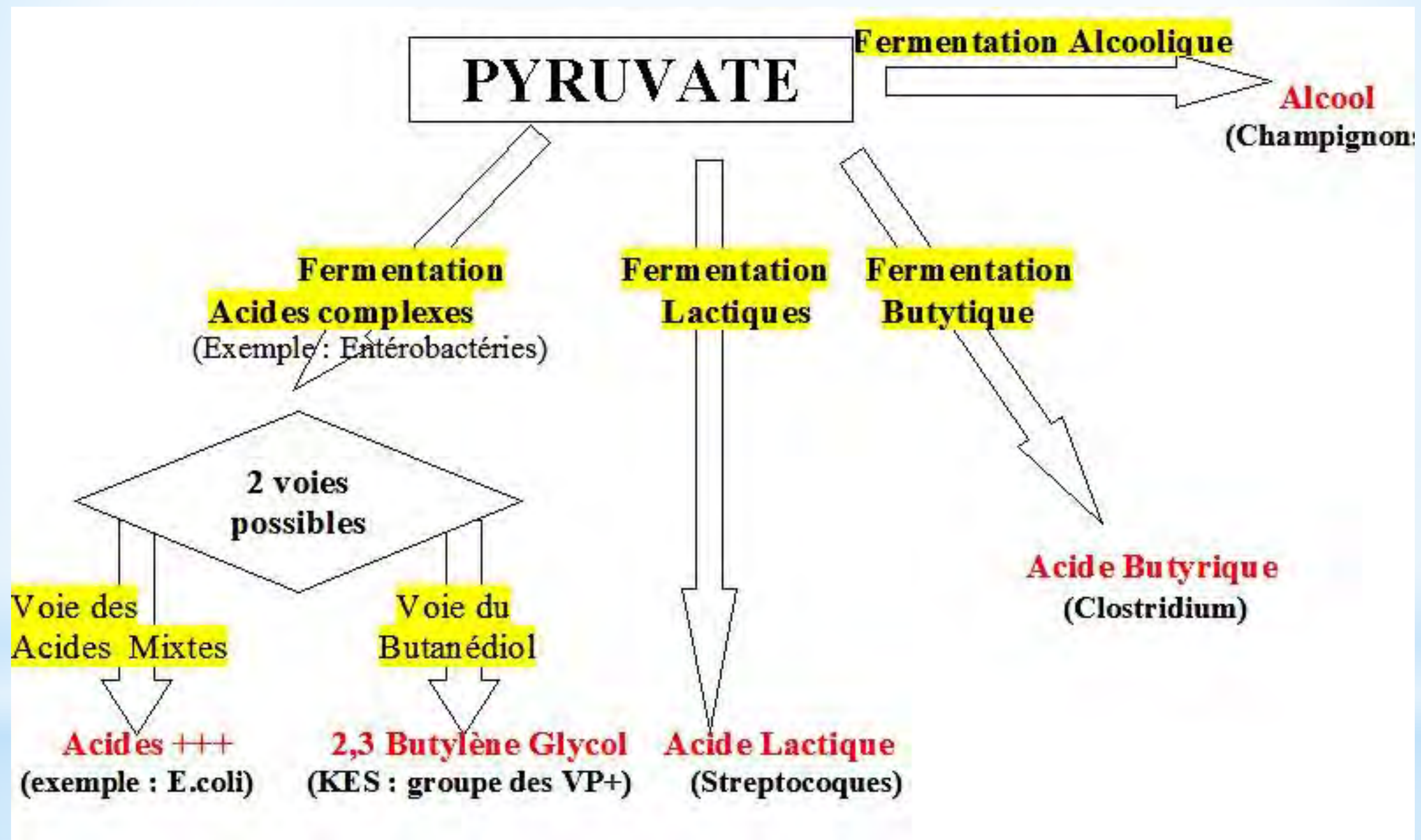
* **Selon l'accepteur final d'électrons et d'H_2 , on peut distinguer :**

1/ Dans la respiration aérobie , l'accepteur final dans la réaction de réduction est l'O_2

2/ Dans la respiration anaérobie , l'accepteur final est un composé inorganique ou ionique (NO_3^- fumarate) et la réaction de réduction fait intervenir une Nitrate réductase.


Krebs
NAD
NADH
+ H+
O2 (accepteur final)
Respiration AEROBIE
H2O2 + ½ O2
NAD
NADH
+ H+
NO3 - (accepteur final)
Respiration ANAEROBIE
NO2-

2-4- Fermentation du Glucose :



* la fermentation Acides complexes

C'est le type de fermentation le plus répandu chez les bactéries.

Elle peut se présenter sous 2 formes possibles:

fermentation Acide Mixte :caractéristique des Enterobactéries VP(-)

fermentation butanédiolique : Les Enterobacteries VP(+) , Listeria monocytogenes,la plupart des Vibrio et Aeromonas

* **Fermentation lactique :**

On distingue 3 modèles:

- Fermentation Homolactique : retrouvée chez les Streptocoques : (gaz - , PH très acide)
- Fermentation Hétérolactique: retrouvée chez les Lactobacilles : (CO_2+++, PH acide).
- Fermentation Aceto-lactique: retrouvée chez des bactéries du genre Bifidobacterium : acide lactique + acide acétique.

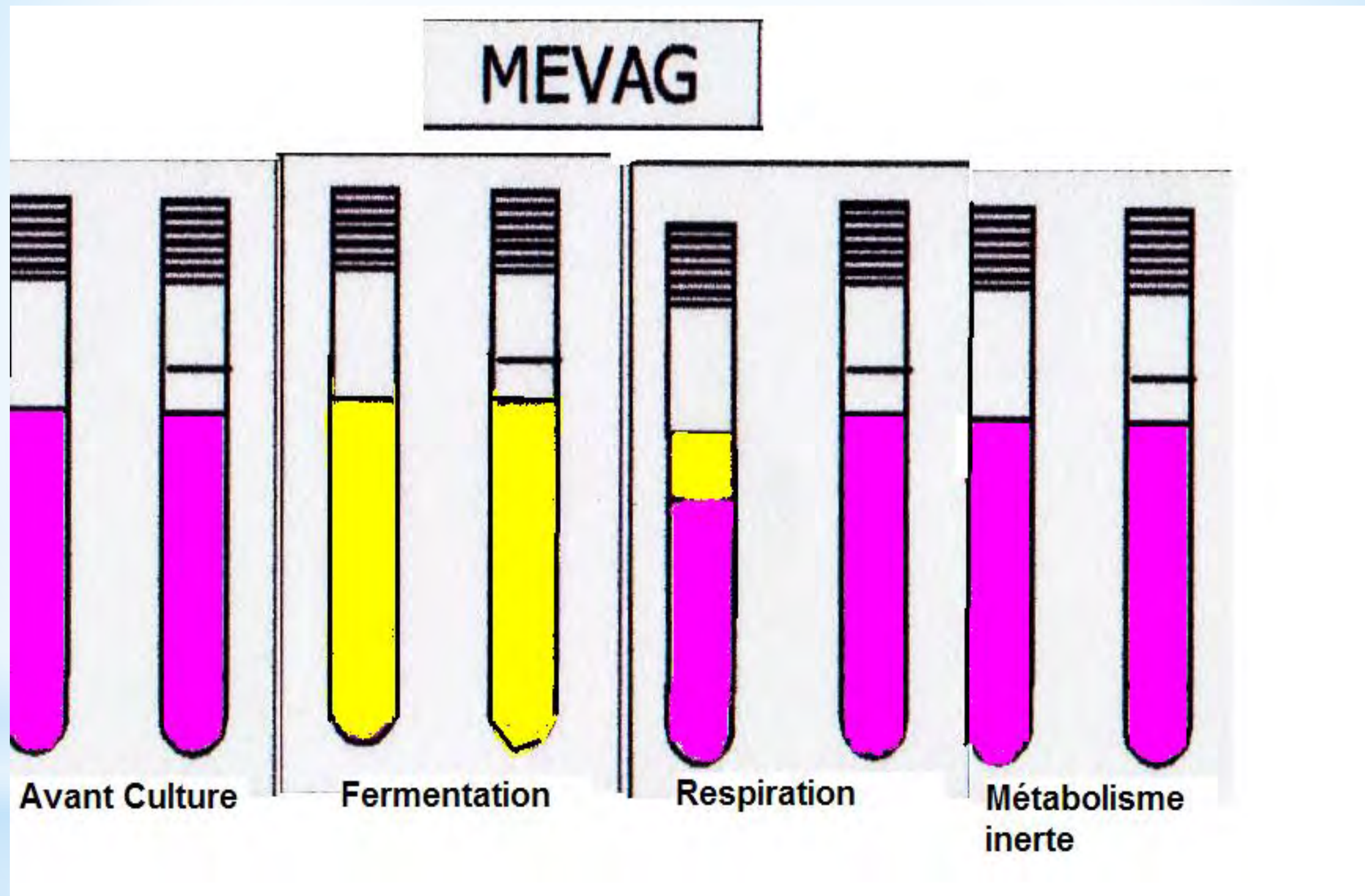
* **Fermentation Alcoolique:** C'est une fermentation retrouvée chez les champignons et les cellules végétales.

* **Fermentation Butyrique :** Elle aboutit à l'Acetate , le Butyrate, H_2 et CO_2 et qui est retrouvée chez les Clostridies dits Saccharolytiques

2-5- Tests d'exploration du métabolisme énergétique :

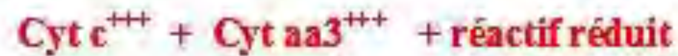
2-5-1- Épreuve de HUGH et LEIFSON :

- **Milieu d' Etude de la Voie d' Attaque des Glucides (M.E.V.A.G) :**
- **Géloses molles , faiblement peptonée , additionnées de glucose à 1%, coulées en culot , régénérées**
- **ensemencement par piqûre centrale de 2 tubes de milieu , à partir d' une suspension riche du germe à étudier.**
- **Un tube est laissé ouvert « O » , l' autre est fermé par une couche de vaseline « F ».**

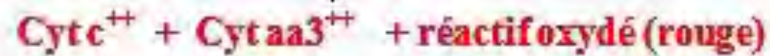

MEVAG
Avant Culture
Fermentation
Respiration
Métabolisme inerte

2-5-2- Test dit de l'Oxydase :

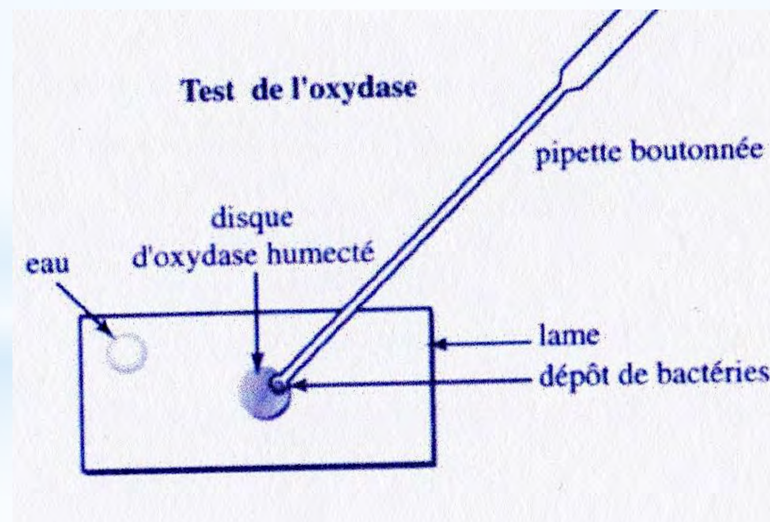
Cyt aa3 + Cytc ont la propriété d'oxyder le dimethyl ou le tetramethylparaphénylène diamine en une demi-quinone rouge.





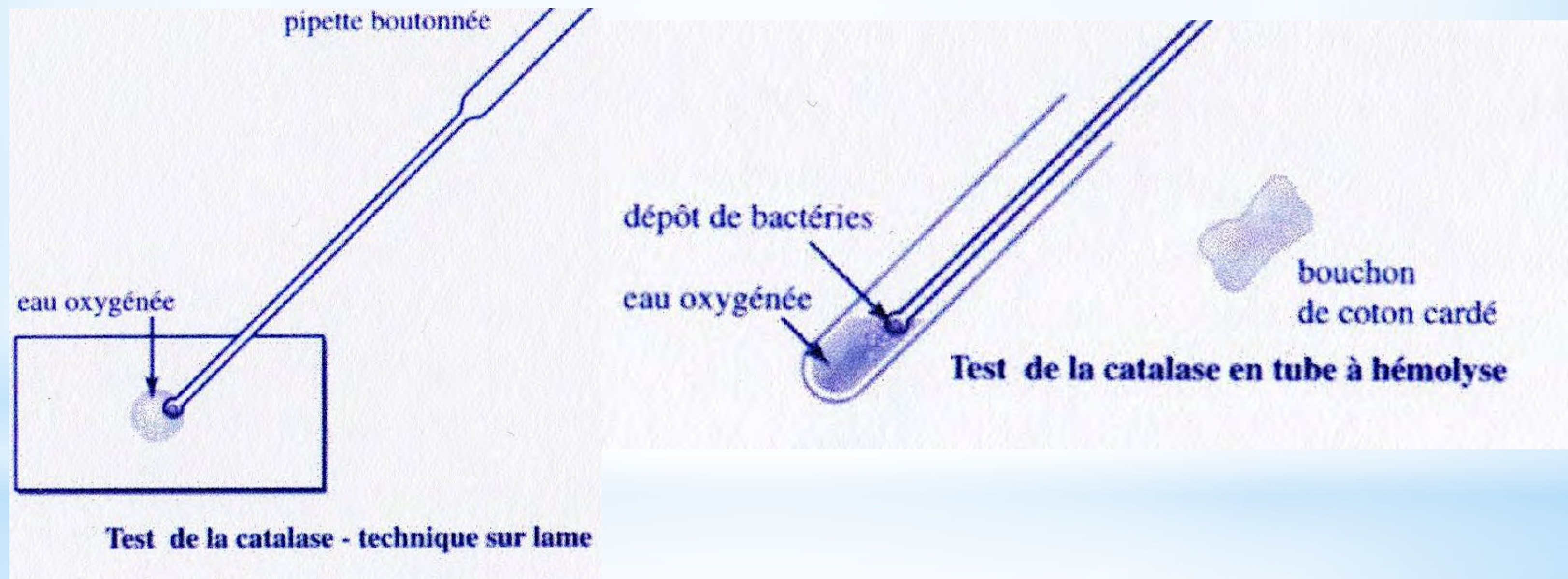


Attention : - ne pas utiliser d'anse bactériologique métallique pour faire le test
- ne pas faire le test à partir d'une pente de TSI ou KIA



2-5-3- Recherche de la catalase : on met en présence une colonie microbienne et une goutte d' eau oxygéné sur une lame . L' apparition de bulles d' air signe la présence d' une catalase .

* **Attention : ne pas prélever la culture à partir d' une gélose au sang.**

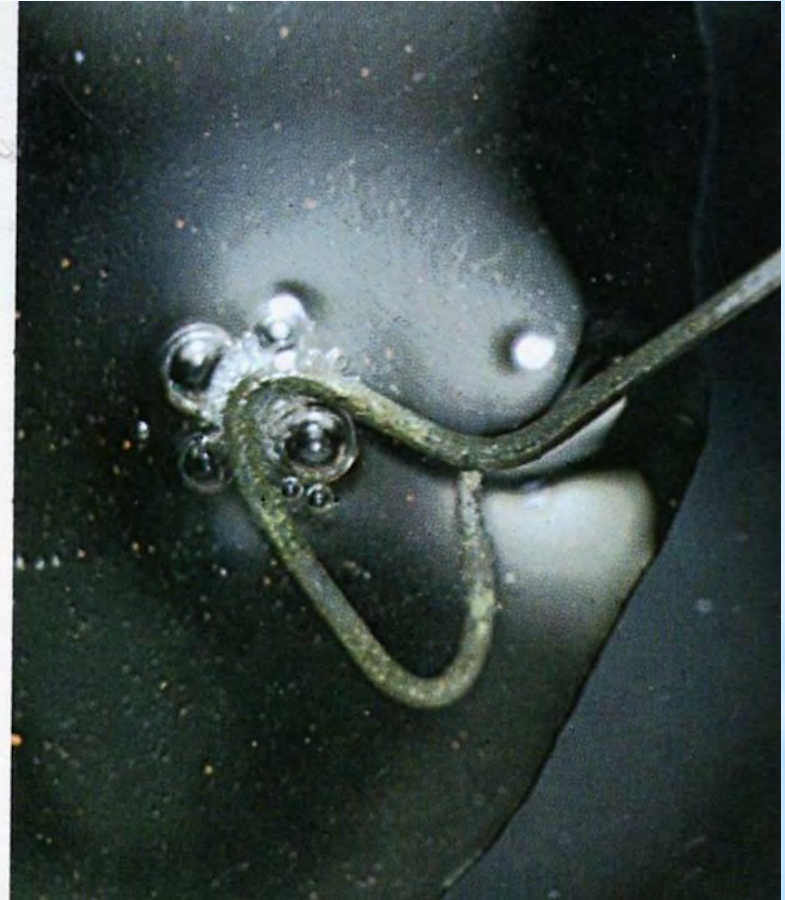


Test de la catalase - technique sur lame

Test de la catalase en tube à hémolyse

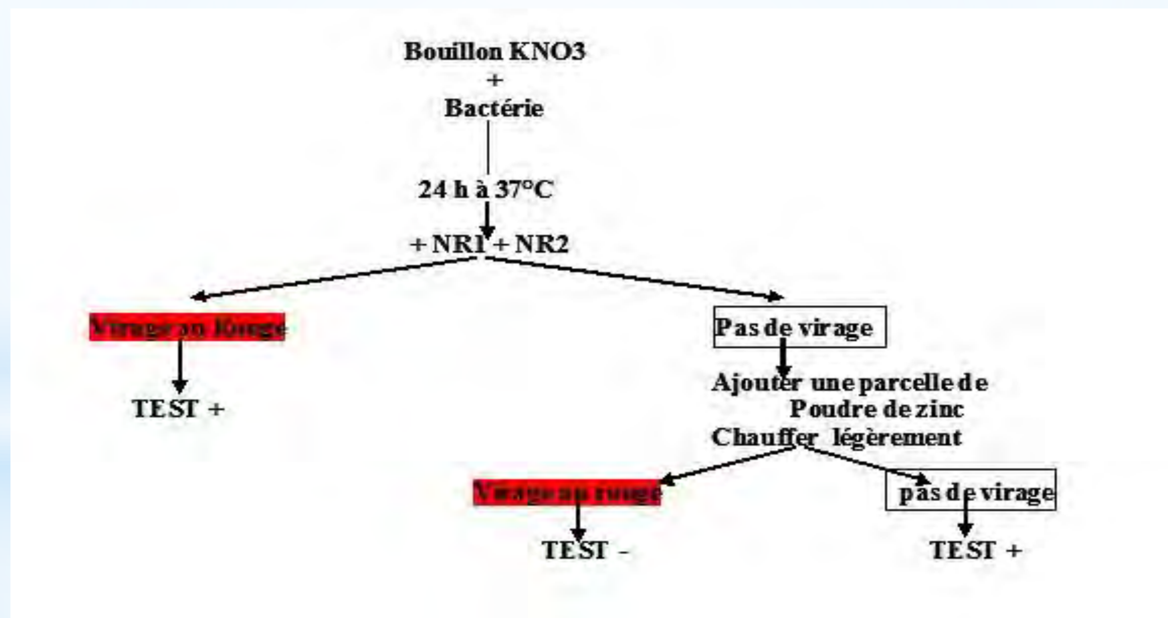
Catalase - **Catalase +**





2-5-4- Test de GRIESS-ILOSWAY :

* Bouillon Nitrate à 1%o KNO3 ensemencé à partir de la souche à étudier
* Réactifs de révélation : Acide Sulfanilique et alpha-naphtylamine
* Poudre de Zinc

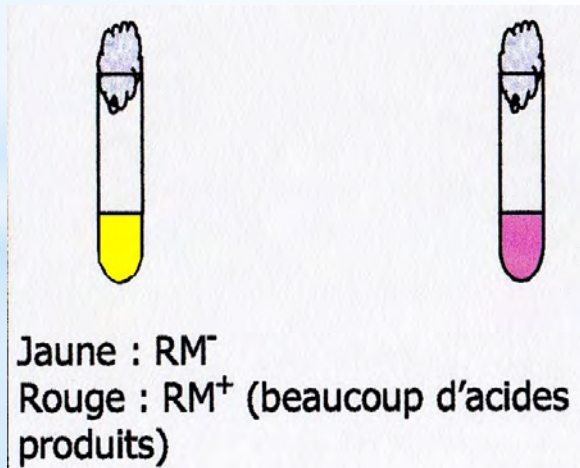


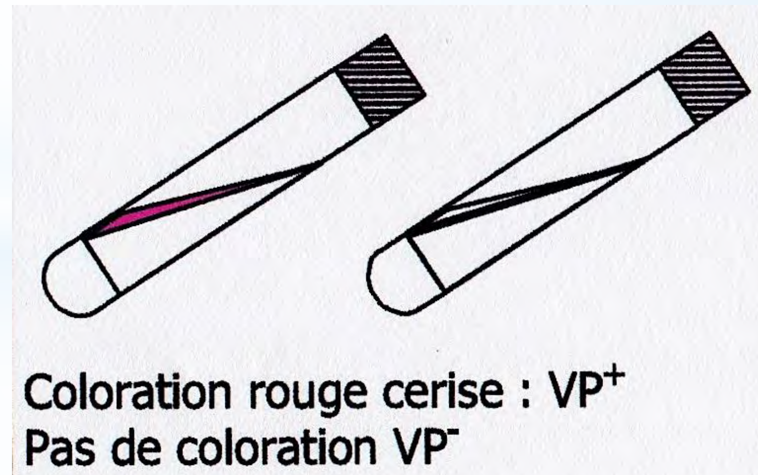
2-5-4- Etude de la voie fermentaire des Acides complexes: Bouillon CLARK et LUBS

* Ensemencement par une goutte d'une suspension trouble
* Après 18h à 37°C, on répartie le bouillon dans 2 tubes stériles.

- Voie des Acides mixtes : Addition d'une goutte de ROUGE de METHYL (test au RM)

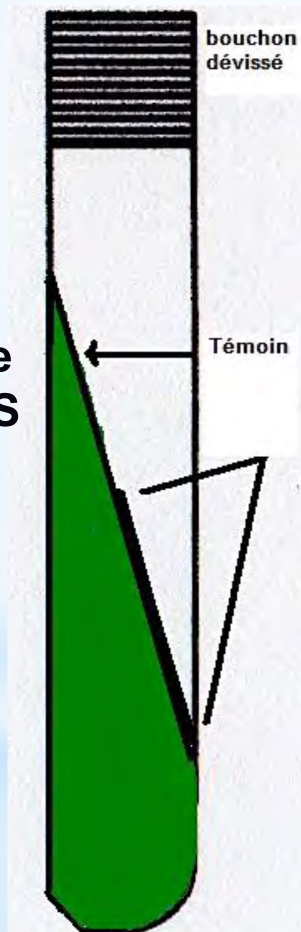
- Voie Butylène-Glycolique : Addition de 2 gouttes de KOH à 10% et d'Alpha-naphtol (Réaction de VOGES-PROSKAUER)

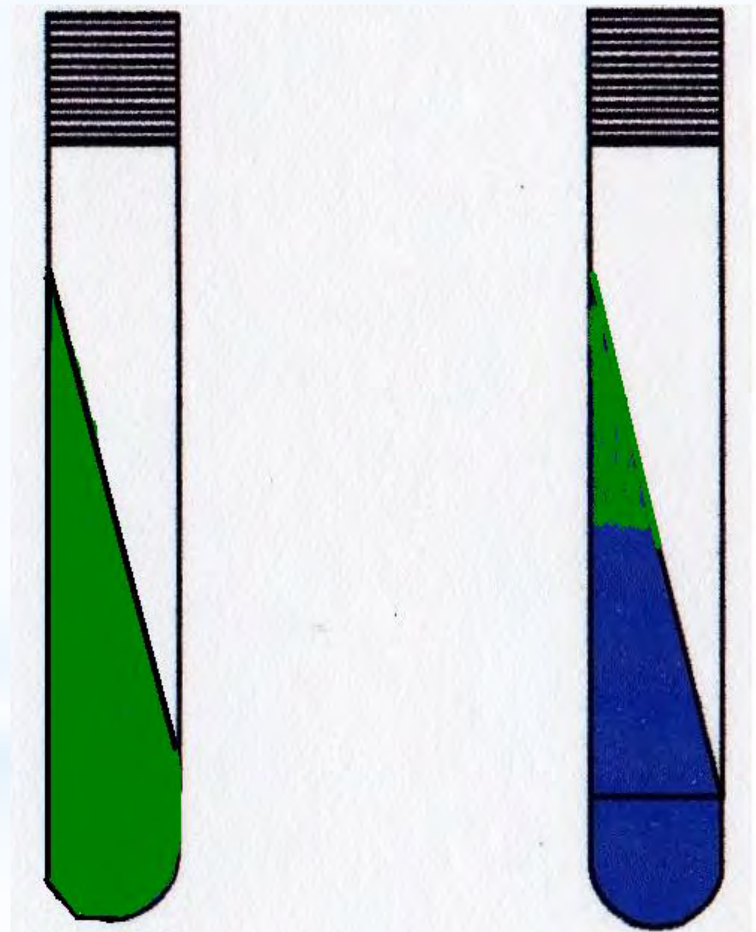




2-5-5- Utilisation du Citrate comme seule source de Carbone : Milieu au Citrate de SIMMONS ou au Citrate de KRISTENSEN

Milieu au Citrate de SIMMONS





Test négatif **Test positif**

3- Métabolisme Glucidique :

3-1- Auxanogramme : Etude d' une gamme de sucres dégradables par la bactérie (en milieu liquide ou solide)

3-2- Etude de l' attaque des sucre en :

- Milieux gélosés glucidiques simples : gélose + sucre + indicateur de pH (exemple : le milieu Mannitol-mobilité-nitrate)
- Milieux gélosés glucidiques complexes :

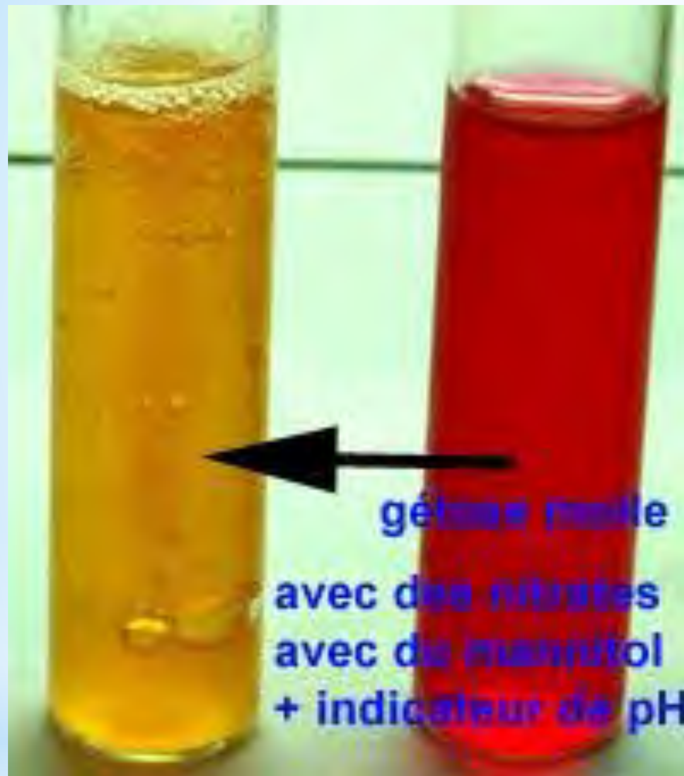
TSI (Tri-Sugar-Iron) et

KIA (Kligler-Iron-agar)

géloses inclinées avec pente +culot :

1%o Glucose et 10%o Lactose et Saccharose

Indicateur de pH = Rouge de Phénol



Mannitol-Mobilité

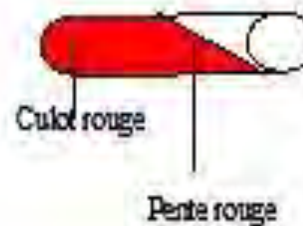


Galerie API 20E (identification des Enterobactéries)

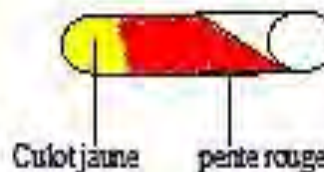
Exemples de Milieux Glucidiques simples

Lecture :

Bactérie oxydative

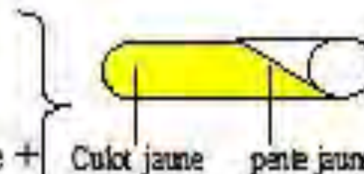


Bactérie fermentaire lactose – et saccharose -

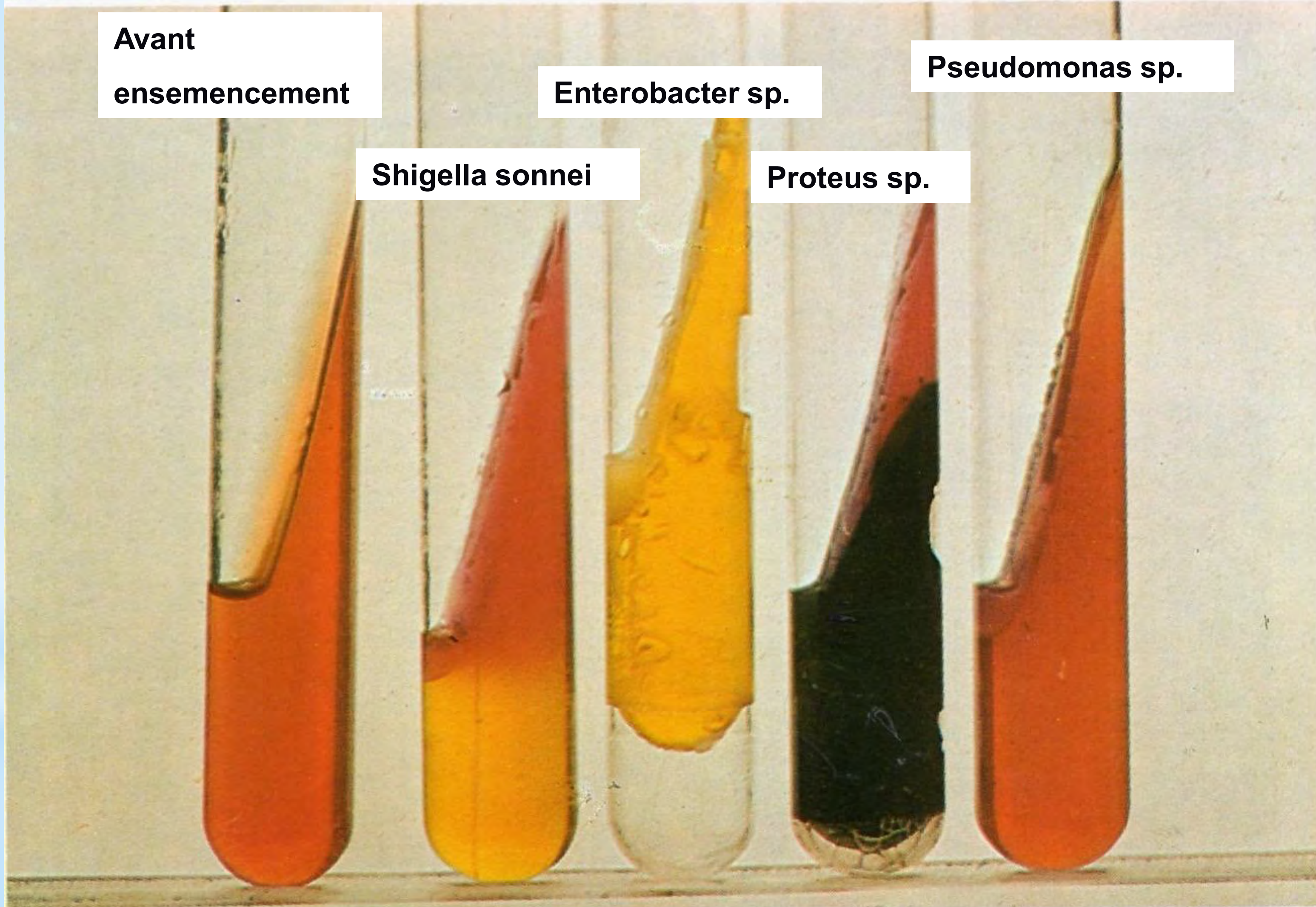


l'attaque des peptones alcalinise la pente

Bactérie Fermentaire lactose + et/ou Saccharose +

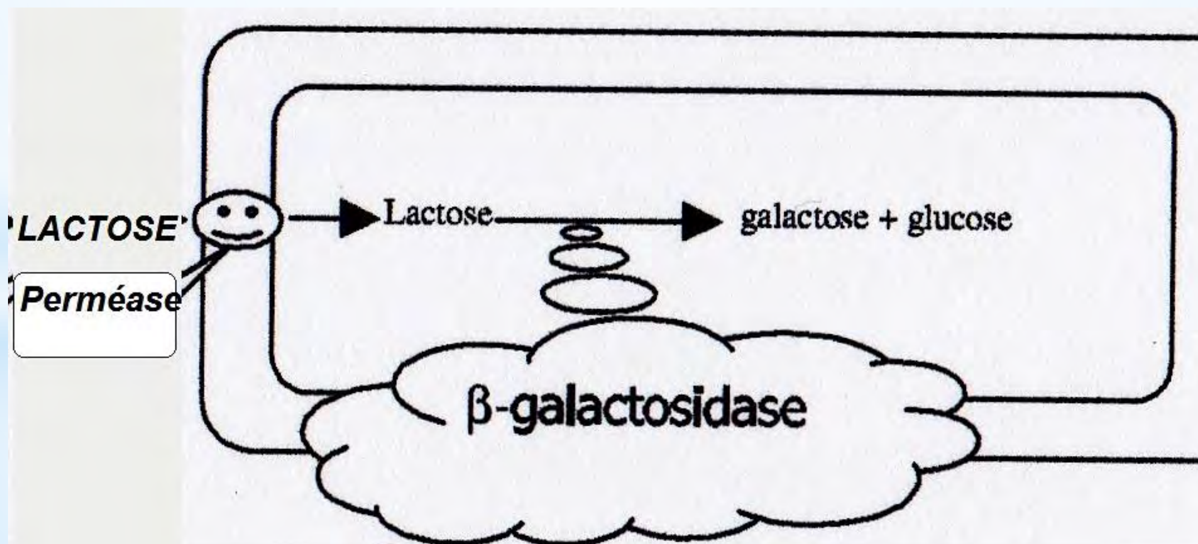


l'attaque des peptones alcalinise la pente mais l'acidification par attaque des sucres prend le dessus.


301
Avant ensemencement
Shigella sonnei
Enterobacter sp.
Proteus sp.
Pseudomonas sp.

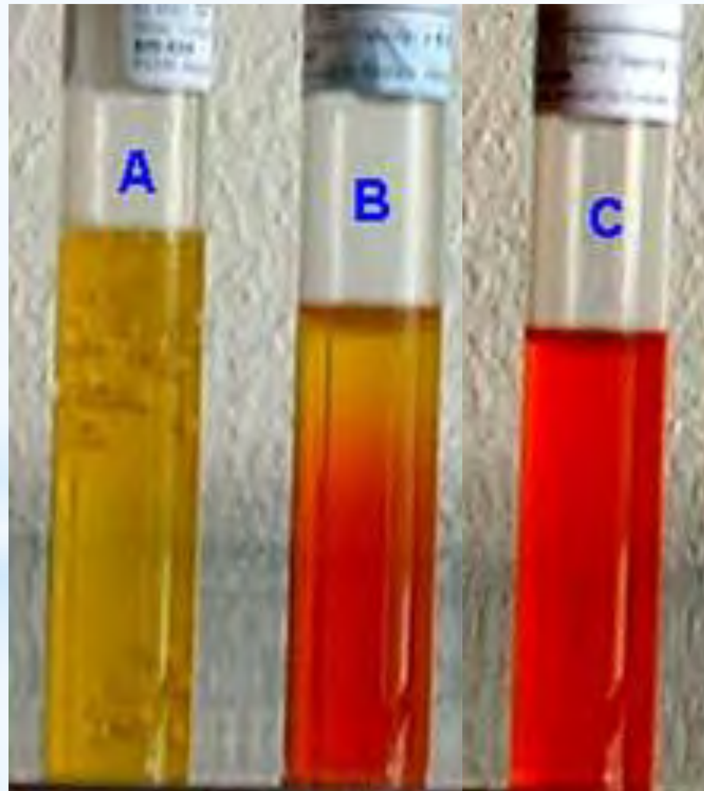
3-3- Révélation d' enzymes du métabolisme glucidique:

* on détecte essentiellement la Bêta galactosidase , enzyme qui dégrade le lactose en glucose et galactose.
* Cette enzyme a 2 caractéristiques : 1) elle est intra-cellulaire
  2) elle est inductible
* Il faut donc une perméase pour faire passer quelques molécules de lactose en intra-cellulaire et induire la synthèse de l' enzyme.

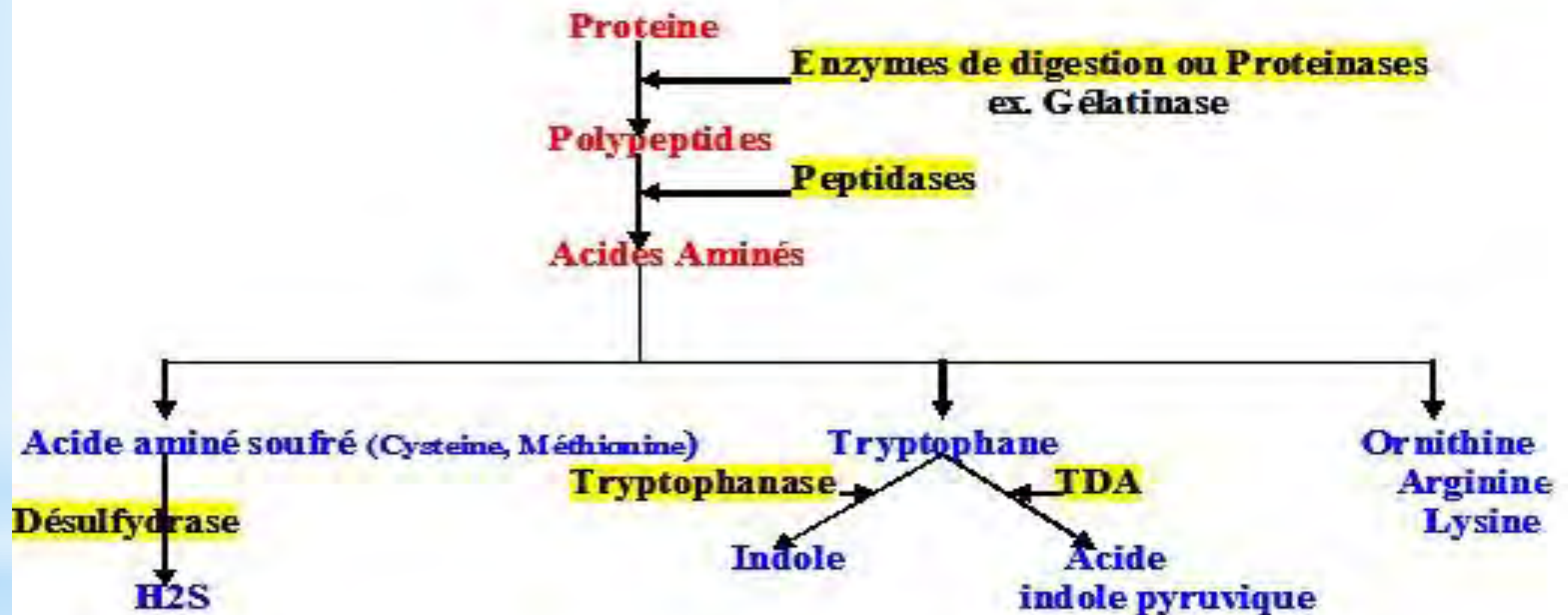


3-4- Etude de la voie énergétique d'attaque d'un sucre :

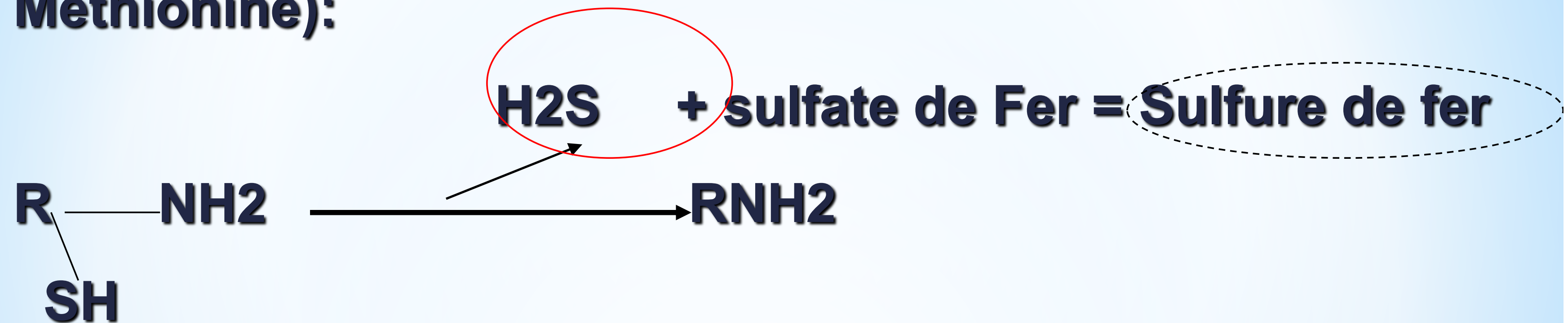
Milieu utilisé : MEVAG SANS SUCRE + sucre à étudier (1%)



4- Métabolisme Protidique :



4-1- Métabolisme des Acides Aminés soufrés (Cystéine, Méthionine):

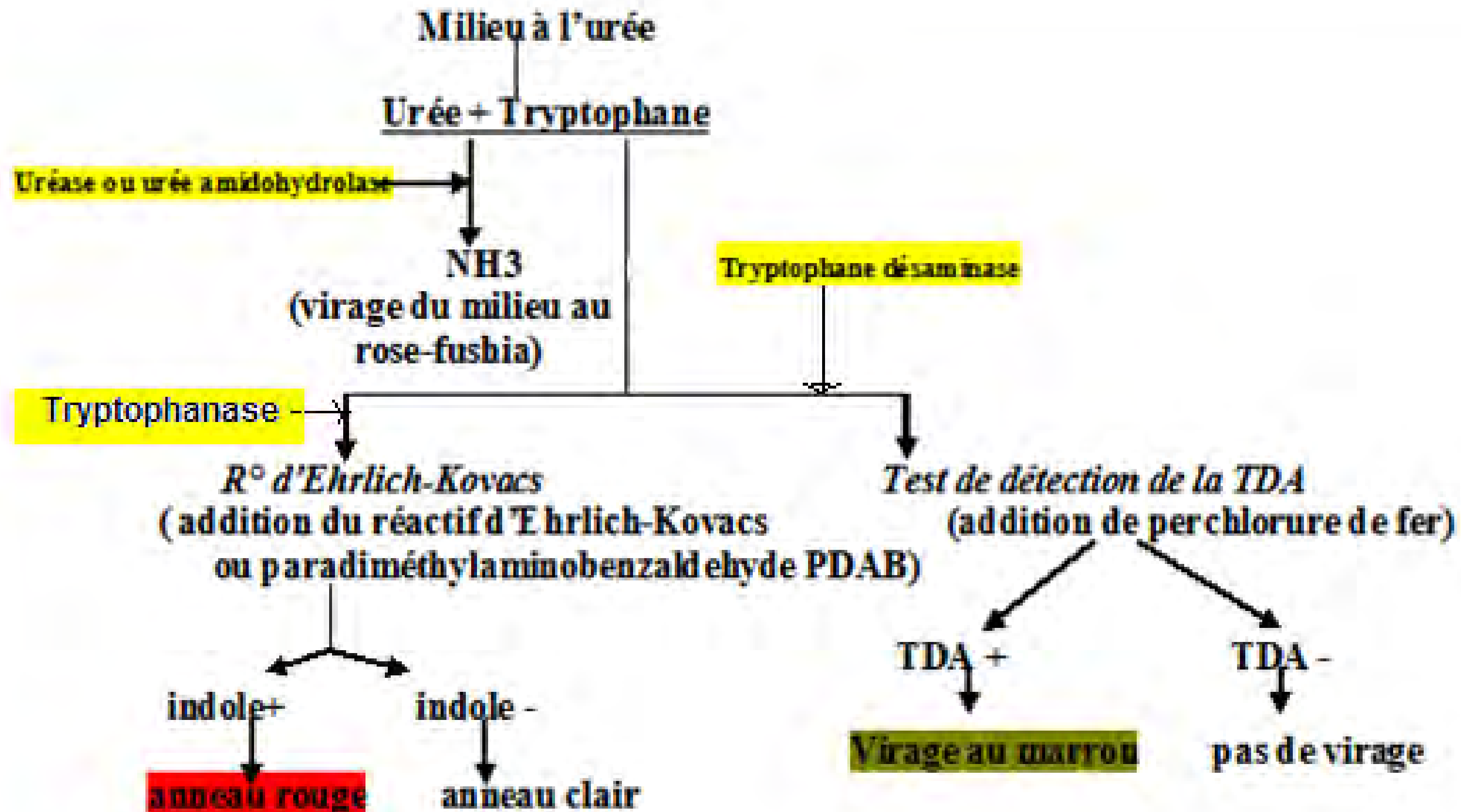


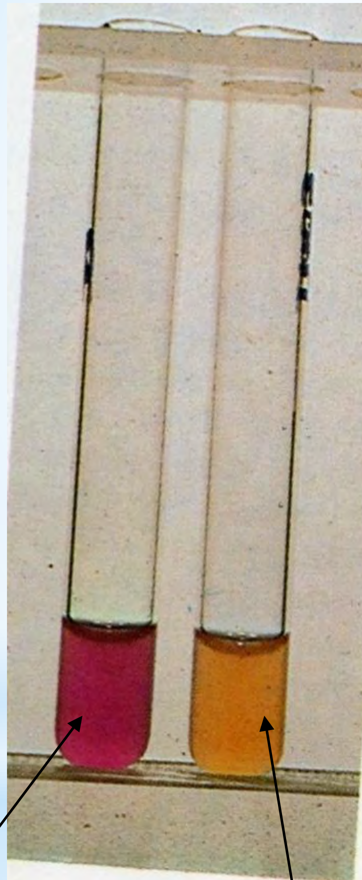
TEST :On utilise le milieu TSI ou KIA (milieux glucidiques gélosés complexes) qui contiennent Thiosulfate de sodium (liaison thiol)

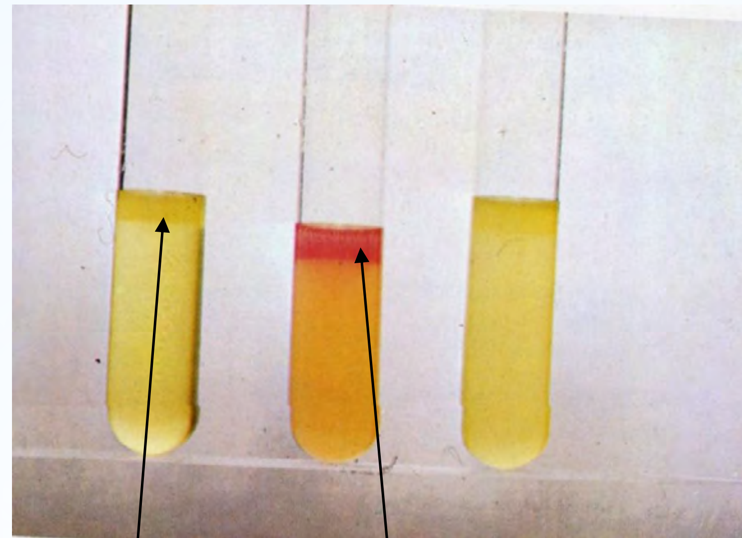




4-2- Métabolisme de l'urée et du Tryptophane



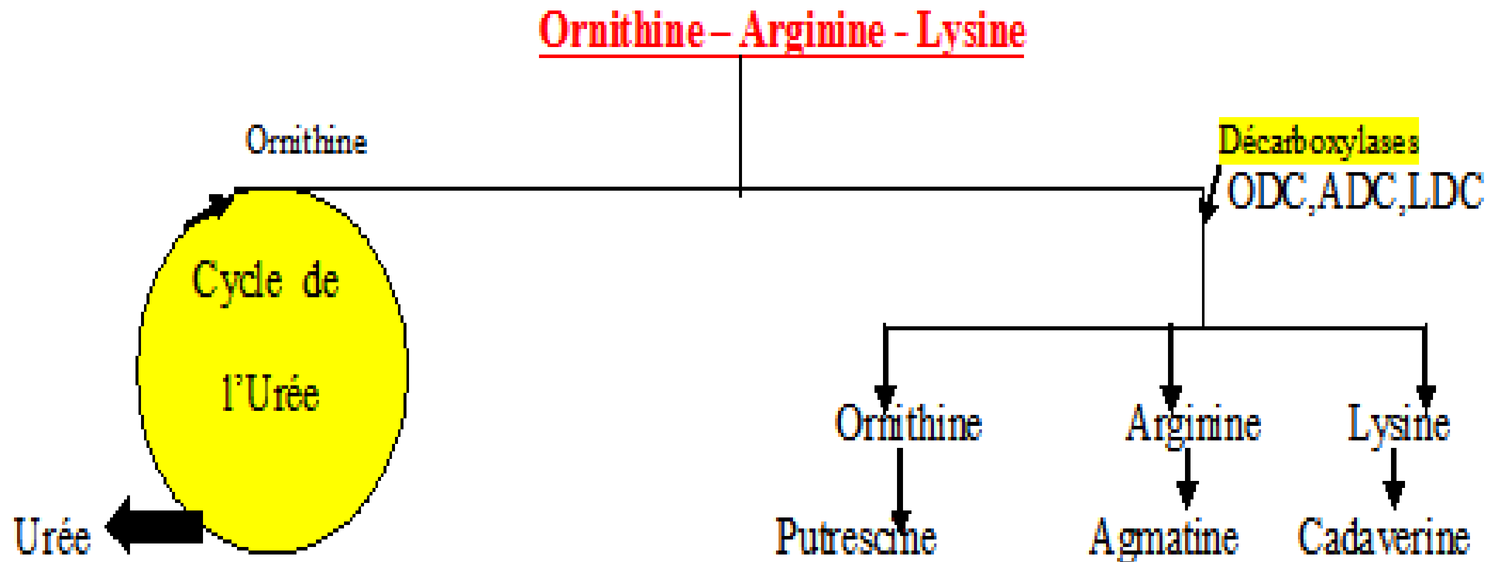




Indole - Indole +

Urée + Urée -

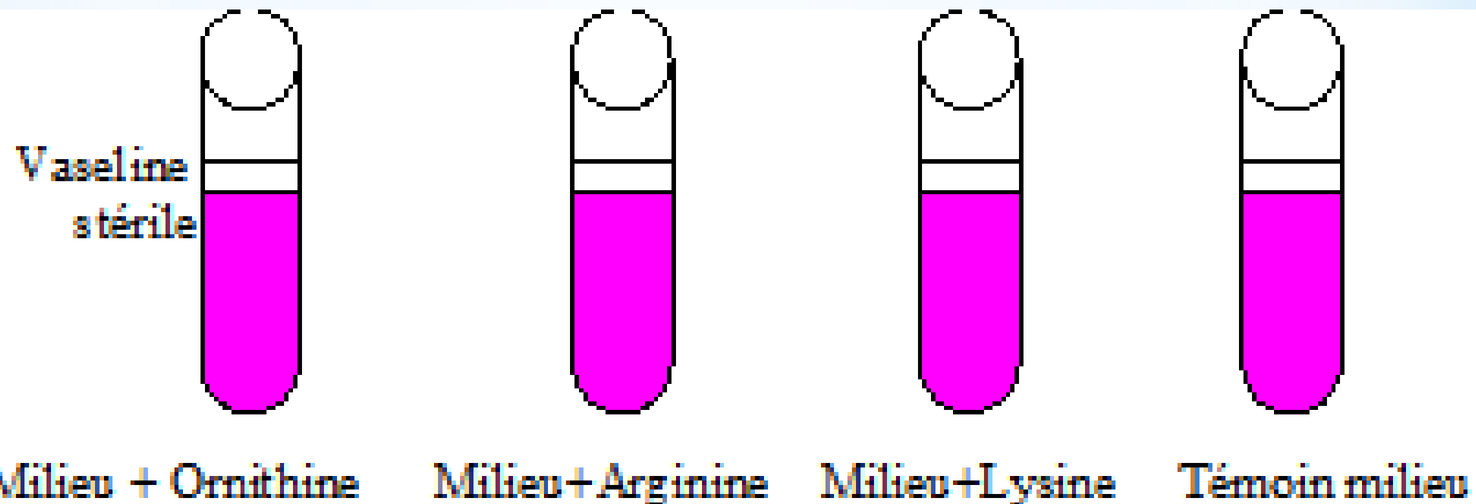
4-3- Catabolisme des Acides Aminés:

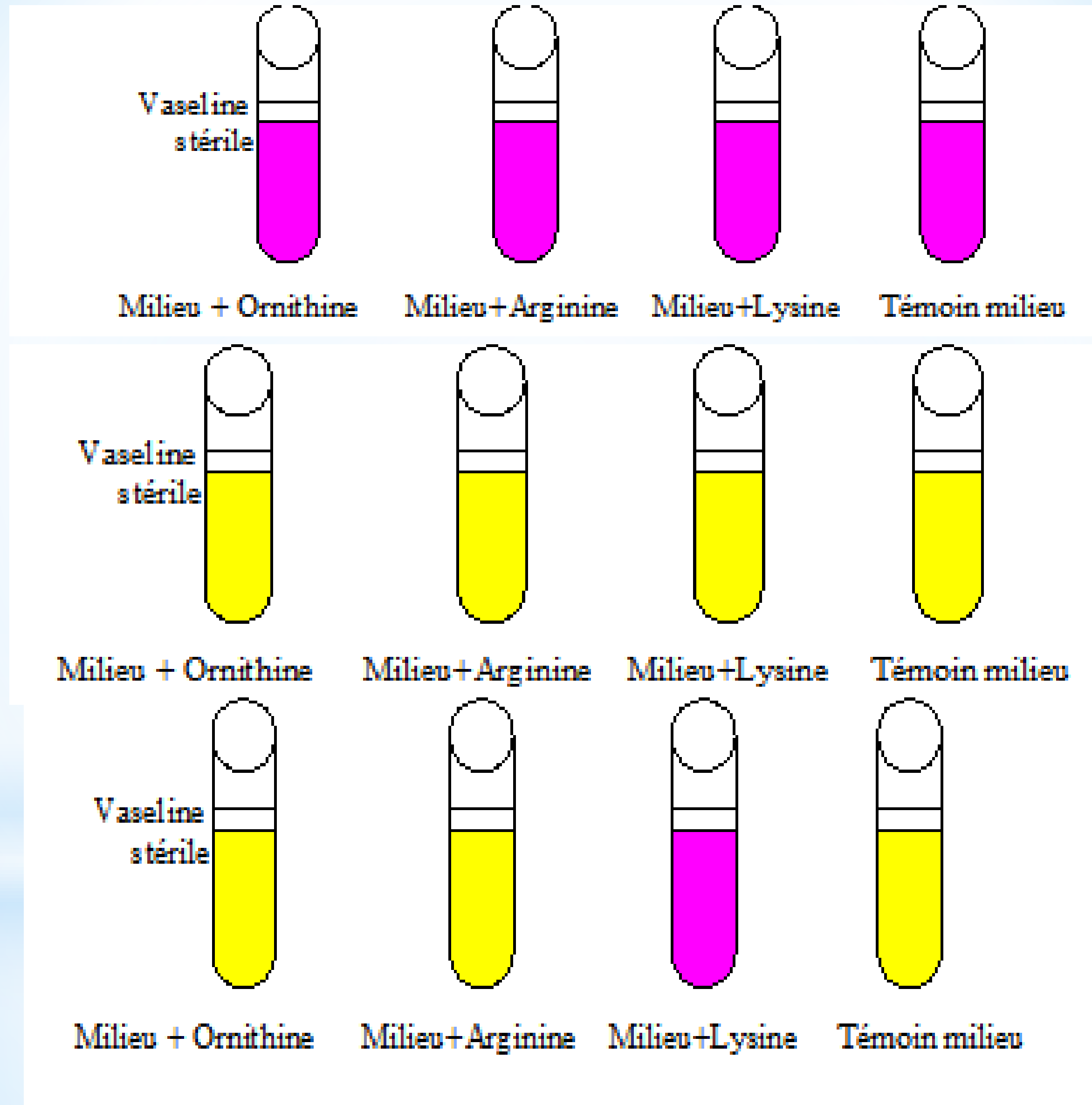


Le test des décarboxylases :

Au laboratoire , on met en évidence les décarboxylases sur milieu de MOELLER-FALKOW :

(sucre=Glucose , Indicateur=Pourpre de Bromocrésol

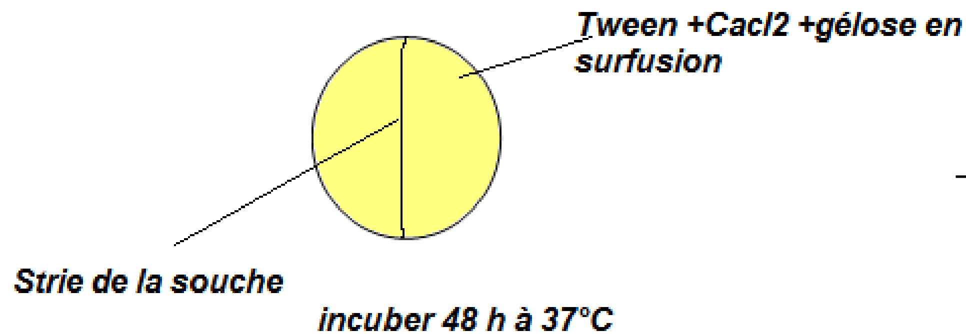



Vaseline
stérile
Milieu + Ornithine
Milieu+Arginine
Milieu+Lysine
Témoin milieu
Vaseline
stérile
Milieu + Ornithine
Milieu+Arginine
Milieu+Lysine
Témoin milieu
Vaseline
stérile
Milieu + Ornithine
Milieu+Arginine
Milieu+Lysine
Témoin milieu

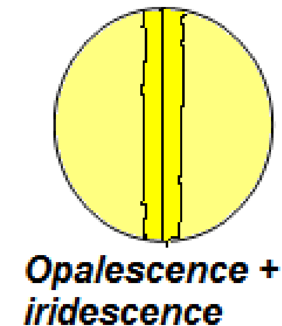
* 5- Métabolisme lipidique :

Lipase : enzyme qui hydrolyse les esters d' acide gras à longue chaîne carbonée.

Test de laboratoire : Technique de SIERRA : Comme ester d' acide gras utilisé au laboratoire , on distingue les TWEEN qui sont des Esters de Sorbitol et d' Acide gras.

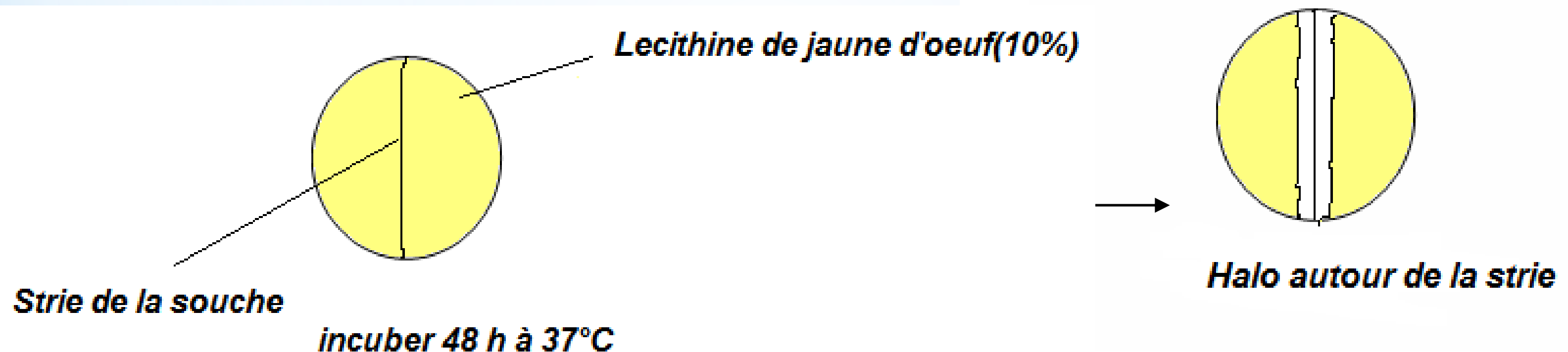






enzymes qui hydrolysent les Lécithines

Test de Laboratoire : on utilise communément la Lécithine du jaune d' œuf incorporé à 10 % dans la gélose (émulsion dans de l' eau physiologique) .



APPLICATIONS DE LA PHYSIOLOGIE BACTERIENNE

1-Le diagnostic bactériologique: culture et identification des germes à partir du prélèvement pathologique (urine , selle , sang , LCR…)



Données de physiologie bactérienne	Implications sur le diagnostic bactériologique
Besoins nutritifs	Choix des milieux de culture
Exigences environnementales (facteurs physico-chimiques)	Choix de la T° et de l'atmosphère d'incubation
Temps de génération, taux de croissance	Délais de culture et rendu du résultat
Croissance bactérienne	Dénombrement des bactéries dans un prélèvement
Type métabolique Caractères biochimiques	Identification bactérienne
Effets des antibiotiques sur la croissance bactérienne	antibiogramme

Hémoculture:

- Systèmes non automatisés:
ex. Hémoculture Signal (OXOID)

Signe de croissance bactérienne= Gaz dégagé par le métabolisme bactérien et détecté par l' Indicateur



- Systèmes automatisés:





Croissance bactérienne détectée via un produit du métabolisme biochimique ;

Exemple : Détection du CO2 d' origine bactérienne

Automate BACT/ALERT et Automate BACTEC


Visualisation
BacT/ALERT
BacT/ALERT



Bibliographie

1- Cours Polycopié du Pr.Benslimani sur le site Internet de la Société Algérienne de Microbiologie Clinique : WWW.samic-inf.com

2- Leclerc H. , Gaillard J.L., Simonet M. Microbiologie générale :La Bactérie et le monde bactérien Edition DOIN 1995

3- Marchal N., Bourdon J.L. , Richard CL .Les Milieux de culture pour l' isolement et l' identification biochimique des bactéries , Édition DOIN 1991

4- Olds R.J. Atlas en couleurs de Microbiologie Édition MALOINE 1979

5- Consultez les liens disponibles dans le site du Réseau AARN (Algerian Antimicrobial Resistance Network) que vous trouverez à l' adresse Internet : WWW.sante.dz